



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Medicina Veterinaria
Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria

**Prevalencia de *Neospora caninum* en perros pastores
de cinco sectores de las unidades de producción de la
empresa Rural Alianza – Puno**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Luis Alfredo VEGA OBREGÓN

ASESOR

Néstor FALCÓN

Lima, Perú

2007



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Vega L. Prevalencia de Neospora caninum en perros pastores de cinco sectores de las unidades de producción de la empresa Rural Alianza - Puno [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina, Unidad de Posgrado; 2007.

CONTENIDO

	Pág.
LISTA DE CUADROS	VIII
RESUMEN	IX
SUMMARY	X
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA	3
2.1. Etiología	3
2.2. Taxonomía	3
2.3. Características Morfológicas y Antigénicas	4
2.4. Ciclo Biológico	5
2.5. Epidemiología	7
2.5.1. Prevalencia	7
2.5.2. Factores de Riesgo	8
2.5.2.1. Hospedadores	8
2.5.2.2. Edad.	9
2.5.2.3. Raza y Sexo.	9
2.5.2.4. El Parasito	9
2.5.2.5. Medio Ambiente	10
2.6. Patogenia.	10
2.7. Inmunidad	12
2.7.1. Respuesta Inmune Celular	12
2.7.2. Respuesta Inmune Humoral	13
2.8. Signos Clínicos	14
2.8.1. Neosporosis en Caninos	15

2.8.2. Neosporosis en Bovinos	16
2.8.3. Neosporosis en Ovinos y Cabras	16
2.8.4. Neosporosis en Equinos	17
2.8.5. Neosporosis en Camélidos Sudamericanos	17
2.9. Lesiones	18
2.9.1. Lesiones Histopatológicas	18
2.10. Importancia Económica	19
2.11. Salud Pública.	20
2.12. Diagnostico	20
2.12.1. Examen Histopatológico	20
2.12.2. Inmunohistoquímica	21
2.12.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa	21
2.12.4. Inmunofluorescencia Indirecta.	22
2.12.5. Inmunoabsorción Ligada a Enzimas.	22
2.12.6. Aglutinación Directa.	23
2.12.7. Inmunoelectrotransferencia	24
2.13. Tratamiento	24
2.14. Control y Prevención	25
 III MATERIALES Y METODOS	 28
3.1. Lugar de Estudio	28
3.1.1. Ubicación	28
3.1.2. Animales	28
3.1.3. Clima	29
3.1.4. Pastizales	29
3.2. Materiales	29
3.2.1. Material de Apoyo	29
3.2.2. Material para la prueba IFI	30
3.3. Diseño Estadístico	30
3.3.1. Tamaño Muestral	30
3.3.2. Estratificación de Muestras	31
3.4. Recolección de Muestras	32
3.5. Procesamiento de la Muestra	33
3.6. Desarrollo de la Técnica	33

3.7. Análisis Estadístico	34
3.7.1. Prevalencia	34
3.7.2. Intervalo de Confianza.	34
3.7.3. Prueba de Chi ²	34
 IV. RESULTADOS	 35
V. DISCUSIÓN	37
VI CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	42
VII BIBLIOGRAFÍA	43

LISTA DE CUADROS

	Pág
Cuadro 1. Estratificación de los caninos según la población en cada sector de producción de la empresa Rural Alianza-Puno 2004.	32
Cuadro 2. Frecuencia de <i>Neospora caninum</i> en perros pastores procedentes de cinco sectores de producción de la empresa Rural Alianza-Puno 2004.	36
Cuadro 3. Frecuencia de <i>Neospora caninum</i> según estrato etareo en perros pastores de cinco sectores de producción de la empresa Rural Alianza-Puno 2004.	36
Cuadro 4. Frecuencia de <i>Neospora caninum</i> según sexo en perros pastores de cinco sectores de producción de la empresa Rural Alianza-Puno 2004.	36

RESÚMEN

La neosporosis es una parasitosis que afecta a una gama de mamíferos domésticos y silvestres; destacando por su importancia la especie bovina, al producir problemas reproductivos como el aborto, y la especie canina al actuar como hospedador definitivo y como fuente de diseminación de la enfermedad. El objetivo del presente trabajo fue determinar la prevalencia de *Neospora caninum* en perros pastores procedentes de cinco zonas de producción de la empresa Rural Alianza ubicado en el departamento de Puno. Se evaluaron 122 muestras de suero canino, recolectadas en los meses de febrero y marzo del 2004 y evaluadas mediante la prueba de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI). Del total de muestras evaluadas se halló una prevalencia de $14.75 \pm 6.29 \%$ (18/122), en una dilución de 1:50. Al evaluar las variables procedencia, edad y sexo, mediante χ^2 no se halló diferencia estadística significativa. Este estudio demostró que los perros de la empresa Rural Alianza poseen una prevalencia moderada ante *Neospora caninum*. Además la prevalencia hallada se relaciona con los estudios realizados en camélidos sudamericanos y bovinos al pastoreo en el departamento de Puno, lo que demostraría que existiría una relación entre los hospedadores intermediarios y el hospedador definitivo, facilitando la transmisión horizontal.

Palabras clave: Neosporosis, canino, IFI, prevalencia, transmisión.

SUMMARY

Neosporosis is a parasitosis which affects several domestic and wild mammals; being one of the most important the bovine species, causing reproductive failure like abortion, and canine species since it is the definitive host and the shedding source for the disease. The aim of the present study was to determine *Neospora caninum* prevalence in shepherd dogs from five production areas at the Rural Alianza Enterprise in Puno Department. A hundred and twenty two samples of canine sera collected during February and March 2004 were evaluated using Indirect Immunofluorescence assay (IFA). A total prevalence of $14.75 \pm 6.29\%$ (18/122) was found, at a 1:50 dilution. At evaluating precedence, sex and age by means of chi square test no statistically significant difference was found. This study demonstrated that dogs from Rural Alianza showed a moderated prevalence for *Neospora caninum*. Besides, prevalence found is related to the ones found in studies in South American camelids and feedlot bovines in Puno, which would show a relationship between definitive and intermediate host making easier horizontal transmission.

Key Words: Neosporosis, canine, IFA, prevalence, transmission.

I. INTRODUCCIÓN

La neosporosis es una enfermedad parasitaria emergente causada por un protozoo denominado *Neospora caninum*, perteneciente al phylum apicomplexa, actualmente se conoce que es causante de trastornos neuromusculares en perros y abortos en bovinos (Dubey, 2003; Thilsted y Dubey, 1989). En 1984 se notificó por primera vez un protozoo como causante de miositis y encefalitis en seis cachorros en Noruega, los cuales resultaron serológicamente negativos a *Toxoplasma gondii* (Bjerkas *et al.*, 1984). En 1988 casos similares fueron descritos en perros en Estados Unidos de América, a partir de los cuales se aisló al parásito que se denominó *Neospora caninum* y la enfermedad como neosporosis (Dubey *et al.*, 1988b).

Diversos estudios han demostrado que *Neospora caninum* tiene un amplio rango de hospedadores, entre estos se encuentran animales domésticos; como bovinos, felinos, caninos, ovinos, equinos, y animales silvestres (coyotes, zorros y lobos). Los estudios de McAllister *et al.* (1998) han confirmado en forma experimental, que el perro es el hospedador definitivo de *N. caninum* y Basso *et al.* (2001a) mediante infección natural, demostraron que los cánidos excretan ooquistes al medio ambiente conjuntamente con las heces el cual podría contaminar el alimento y el agua.

Los estudios realizados en cánidos relacionados con su sintomatología y diagnóstico de laboratorio, realizados por diversos autores, confirman que el daño nervioso es evidente en la mayoría de los casos y pueden presentarse con otras patologías que agravan el cuadro clínico, presentándose en animales de diferentes edades (Basso *et al.*, 2005; Boyd *et al.*, 2005; Cantile *et al.*, 2002 y Lorenzo *et al.*, 2002). Sin embargo, la

seroprevalencia en perros han determinado que existe una mayor cantidad de animales con infección subclínica que animales que desarrollan la enfermedad (Dubey, 2003).

La importancia económica en el sector pecuario, se debe a que producen pérdidas productivas y reproductivas, relacionadas con abortos, disminución en el número de crías, disminución en la producción láctea principalmente en el ganado vacuno. En el Perú, también se confirma las repercusiones económicas y sanitarias de esta enfermedad en la especie bovina (Andresen, 1999). Además se vienen realizando estudios en especies nativas como son los camélidos sudamericanos (CSA) reportando prevalencias variadas. Sin embargo, hasta el momento no se ha demostrado las repercusiones económicas y sanitarias, siendo la crianza de CSA una actividad económica de gran importancia para el poblador andino.

En el Perú existen estudios serológicos realizados en caninos. Así, tenemos en el Valle de Lima una prevalencia de 32.7% (Del campo *et al.*, 2003) en la provincia de Chachapoyas 28.87% (Horna *et al.*, 2003) y 19.4 % en el Valle del Mantaro (Cornejo *et al.*, 2004). En diferentes países encontramos prevalencias variables, así tenemos: 37.8% en Argentina (Basso *et al.*, 2001b), 11% en Bélgica (Barber *et al.*, 1997a), 9% Australia, 22% Tanzania, 20% Uruguay (Barber *et al.*, 1997b), y 8.3% en Brazil (Canon-Franco *et al.*, 2003).

En las zonas altoandinas se ha reportado infección de neosporosis en bovinos al pastoreo (Atoccsa *et al.*, 2005) y llamas (Moya *et al.*, 2003). Sin embargo no existen estudios serológicos en caninos procedentes de estas zonas del altiplano, por este motivo el objetivo de este trabajo fue determinar la prevalencia de *Neospora caninum* en perros de cinco sectores de producción de la empresa Rural Alianza en el departamento de Puno, contribuyendo así a un mejor conocimiento de la epidemiología de la enfermedad en nuestro país.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Etiología.

La neosporosis es una enfermedad parasitaria de distribución mundial causada por un protozoo denominado *Neospora caninum* que afecta a diferentes especies de animales; produciendo alteraciones neuromusculares en los perros y abortos o mortalidad neonatal en los bovinos (Dubey, 2003). En 1984 se identificó por primera vez la enfermedad en Noruega en una camada de perros con miositis y encefalomiелitis que parecía estar asociada a un parásito similar al *Toxoplasma gondii*. Sin embargo, los animales afectados no presentaron anticuerpos contra este parásito (Bjerkas *et al.*, 1984).

En 1988, en EEUU se aisló un parásito de características similares en muestras procedentes de 10 perros muertos con alteraciones neurológicas, demostrándose que se trataba de un parásito estructuralmente distinto al *Toxoplasma gondii*, el cual fue denominado *Neospora caninum* (Dubey *et al.*, 1988b). Thilsted y Dubey (1989) reportaron los primeros hallazgos de *Neospora caninum* en los fetos abortados de vacas lecheras en EEUU.

2.2. Taxonomía.

Neospora caninum es un parásito intracelular que actualmente está clasificado (Dubey *et al.*, 1988b; Ellis *et al.*, 1994).

Phylum:	Apicomplexa
Clase:	Sporozoea.
Subclase:	Coccidia.
Orden:	Eucoccidia.
Suborden:	Eimeriina.
Familia:	Sarcocystidae
Generos:	<i>Toxoplasma</i>
	<i>Sarcocystis</i>
	<i>Hammondia</i>
	<i>Besnoitia</i>
	<i>Neospora</i>
Especie:	<i>Neospora caninum</i>

Existen características que separan a *N. caninum* de *T. gondii* y de otras coccidias cercanas como *Hammondia* o *Besnoitia*, permitiendo así que el género *Neospora* sea considerado como un género independiente (Dubey *et al.*, 2002). *N. caninum* es morfológicamente distinto a *T. gondii*, presentando una pared quística más gruesa; éstos quistes se han encontrado exclusivamente en el tejido nervioso a diferencia de los quistes de *T. gondii*, los cuales pueden estar en diversos órganos como corazón, hígado, riñón (Dubey *et al.*, 2002).

2.3. Características Morfológicas y Antigénicas.

Los únicos estadíos del ciclo biológico identificados hasta el momento son: taquizoitos, quiste con bradizoitos y ooquiste. Los taquizoitos son de morfología semilunar a ovoide con la estructura típica de las formas infectantes de los Apicomplexa. Su tamaño es de 3-7 μm . de longitud y 1-5 μm de anchura, como resultado de la endodiogenia, se producen dos zoitos idénticos y de estos, otros dos, pudiendo albergar una célula hospedera más de 100 taquizoitos. En los hospedadores parasitados se han encontrado taquizoitos en diferentes tipos celulares: neuronas, macrófagos, fibroblastos, células endoteliales de los túbulos renales y hepatocitos (Dubey *et al.*, 1988a). Además, en la musculatura estriada, los taquizoitos son muy frecuentes en perros infectados,

aislándose fácilmente del músculo cuádriceps (Barber *et al.*, 1996; Dubey *et al.*, 2003; Peters *et al.*, 2001).

Los taquizoitos penetran en la célula hospedera en menos de cinco minutos (Hemphill *et al.*, 1996), ubicándose en una vacuola parasitófora en el interior del citoplasma, estos taquizoitos poseen 22 microtúbulos subpeliculares, un conoide, hasta 150 micronemas, de ocho a 18 roptrias, aparato de golgi, una mitocondria, así como un retículo endoplásmico rugoso y liso, núcleo y nucleolo (Lindsay *et al.*, 1999).

Los quistes tisulares que contienen a los bradizoitos, tienen forma redondeada u ovalada, y pueden medir hasta 107 μm . de longitud y se han observado tanto en tejido nervioso (cerebro, médula espinal y nervios periféricos), tejido muscular y retina de diversas especies con infecciones naturales y experimentales (Barr *et al.*, 1992; Kobayashi *et al.*, 2001). La pared del quiste es lisa y gruesa a diferencia del *Toxoplasma*, puede llegar a medir más de 4 μm . de grosor. Los bradizoitos son delgados, miden 6-8 por 1-1,8 μm . y contienen las mismas organelas que los taquizoitos aunque en éstos el número de roptrias es menor (Dubey y Lindsay, 1996).

Recientemente, se han aislado ooquistes de *N. caninum* procedentes de infecciones experimentales en el perro. Morfológicamente, se han observado pocas diferencias respecto a los de *T. gondii*, porque tienen forma subesférica y su tamaño es de 11,7 μm . de longitud y 11,3 μm . de anchura, apreciándose en su interior dos esporoquistes (8,4 x 6,1 μm .) con cuatro esporozoitos (6,5 x 2,0 μm .) cada uno (McAllister *et al.*, 1998; Lindsay *et al.*, 1999; Basso *et al.*, 2001a; Dubey *et al.*, 2002).

2.4. Ciclo Biológico.

En su ciclo biológico puede diferenciarse una fase sexual (cánidos) y otra asexual (rumiantes, cánidos, équidos, etc.), con formación de taquizoitos y quistes tisulares conteniendo bradizoitos (Dubey y Lindsay, 1996; McAllister *et al.*, 1998). El canino doméstico, reconocido como hospedador definitivo, se va a infectar al ingerir los quistes que se encuentran en los tejidos de los hospedadores intermediarios (placenta, restos de fetos abortados y en las descargas uterinas) (Dijkstra *et al.*, 2002b). Los quistes tisulares

son de forma redondeada u ovalada y contienen dentro a los bradizoitos, los cuales se sugiere son los únicos que pueden inducir la excreción de ooquistes en los cánidos (Lindsay *et al.*, 2001). Los quistes tisulares con bradizoítos en su interior, responsables de la fase crónica de la infección, han sido observados tanto en el tejido nervioso (cerebro, médula espinal, nervios periféricos y retina) de diversas especies con infecciones naturales y experimentales (Barr *et al.*, 1992; Kobayashi *et al.*, 2001) como en el tejido muscular esquelético del perro y de la vaca con infecciones naturales (Peters *et al.*, 2001).

El perro elimina al medio ambiente los ooquistes sin esporular, en las heces; transcurridas 48 a 72 horas aproximadamente estos esporulan y se vuelven infectivos (Lindsay *et al.*, 2001), contaminando el medio ambiente. Así mismo, puede actuar como hospedador intermediario. Sin embargo; se desconoce si los perros pueden eliminar ooquistes tras la ingestión de ooquistes esporulados y no se han evidenciado las fases enteroepiteliales. Al ser ingerido los ooquistes, por el bovino, llegan al tracto gastrointestinal y se liberan los esporozoitos, los cuales penetran en las células entéricas transformándose en taquizoitos (Gondim *et al.*, 2002).

Los taquizoitos, penetran las células por invasión activa y se localizan en el citoplasma de macrófagos, células neurales, fibroblastos, hepatocitos, miocitos y en las células epiteliales de los túbulos renales, dentro de una vacuola parasitófora, multiplicándose mediante endodiogenia pudiendo albergar una célula más de 100 taquizoitos (Hemphill *et al.*, 1996; Gondim *et al.*, 2002). Tras la ruptura celular, los taquizoítos salen al medio extracelular y en pocas horas se iniciarán los mecanismos de adhesión e invasión de nuevas células diana (Hemphill *et al.*, 1996). La destrucción celular y, por consiguiente, la enfermedad depende de un equilibrio entre la habilidad de los taquizoítos para penetrar y multiplicarse en la célula hospedadora y la habilidad del hospedador para inhibir la multiplicación del parásito. Los mecanismos implicados en la conversión del taquizoíto en bradizoíto, y por tanto en el paso de una fase de infección aguda a una crónica, no han sido esclarecidos.

2.5. Epidemiología.

La neosporosis fue descrita en el año 1988 como una enfermedad neuromuscular en perros, y el descubrimiento de *N. caninum* como agente causal de abortos en ganado bovino impulsó el desarrollo de los primeros estudios sobre la enfermedad en esta especie. En los últimos años, la importancia de la neosporosis bovina se ha incrementado notablemente, realizándose numerosos trabajos para conocer la prevalencia real de la infección y la participación de *N. caninum* en la producción de aborto y mortalidad neonatal.

No obstante, en algunos países, la información es todavía escasa y los datos que se tienen, refieren únicamente hallazgos esporádicos del agente etiológico o de las lesiones que origina en fetos bovinos abortados, por lo tanto, son necesarios más estudios epidemiológicos que permitan conocer la prevalencia, los factores de riesgo asociados y la importancia real, tanto económica como sanitaria de la enfermedad (Moen *et al.*, 1998).

2.5.1 Prevalencia.

Las prevalencias más estudiadas se dan en la especie bovina, considerada fluctuante en los diferentes países. En Suiza se encontró 29% (Gottstein *et al.*, 1998), 7.6% en Nueva Zelanda (Reichel, 2000) Las tasas de seropositividad en los animales con antecedente de aborto fueron más elevadas entre el 9,2% en Escocia (Trees *et al.*, 1994) y el 26% en Francia (Klein *et al.*, 1997). En animales de explotaciones con problemas reproductivos, la tasa de seroprevalencia fue del 4 y del 23% en Alemania (Conraths *et al.*, 1996). En Argentina la tasa de seroprevalencia en animales con antecedente de aborto ascendió a un 57% (Campero *et al.*, 1998).

En Perú, se han realizado numerosos estudios de serología con Inmunofluorescencia Indirecta en bovinos, encontrando seroprevalencias de anticuerpos de 57 % (59/104) en rebaños de Santa Rita en Arequipa y 27% (46/173) en bovinos del valle de Lima (Andresen, 1999) y luego Rivera *et al.* (2000) encontraron un 62,1% (18/29) en vacas abortadas de nueve hatos lecheros del valle de Lima. Posteriormente

Silva *et al.* (2002), en establos lecheros de la misma región encontraron un 29,61% (90/304) y recientemente Quevedo *et al.* (2003), encontraron un 40.38% (107/265) de anticuerpos anti-*Neospora caninum* en rebaños de crianza extensiva de Chachapoyas. Así mismo Atoccsa *et al.* (2005) reportó 18.1% (76/419) en bovinos al pastoreo en zonas alto andinas, en el departamento de Puno. Y existen estudios serológicos realizados en caninos, así tenemos: en el Valle de Lima con una prevalencia de 32.7% (34/104) (Del Campo *et al.*, 2003), en la provincia de Chachapoyas con 28.87% (41/142) (Horna *et al.*, 2003) y 19.4 % (24/124) en el Valle del Mantaro (Cornejo *et al.*, 2004). En diferentes países encontramos prevalencias variables, así tenemos: 37.8% en Argentina (Basso *et al.*, 2001b), 11% en Bélgica (Barber *et al.*, 1997a), 9% Australia, 22% Tanzania, 20% Uruguay (Barber *et al.*, 1997b), y 8.3% en Brazil (Canon-Franco *et al.*, 2003). Así mismo Wouda *et al.* (1999) reportó un predominio mayor en perros de granjas (23.6%) comparado con perros urbanos (5.5%).

2.5.2. Factores de Riesgo.

Existe, por el momento, poca información acerca de los factores potenciales, de interés epidemiológico y/o clínico, que pueden estar asociados a la infección por *N. caninum*. Entre los factores estudiados hay que señalar los dependientes del hospedador, del parásito y del manejo o del medio.

2.5.2.1. Hospedadores.

Los Hospedadores definitivos, definidos hasta el momento es el perro doméstico y el coyote (McAllister *et al.*, 1998; Gondin *et al.*, 2004a). Los hospedadores definitivos se infectan al consumir carne contaminada con quistes. En los quistes, los bradizoítos conservan su capacidad infectante durante períodos de tiempo prolongados (al menos 1 año en cerebro de ratones con infección experimental) y son resistentes a la acción del ácido clorhídrico (HCl) y la pepsina (Lindsay y Dubey, 1990), lo que corrobora la hipótesis demostrada de que el hospedador definitivo es un carnívoro (perro).

Entre los hospedadores intermediarios de mayor importancia destaca la especie bovina, en un estudio realizado por Anderson *et al.* (1997) determinaron que la

transmisión vertical es de mayor importancia ya que el parásito atraviesa la barrera transplacentaria; esto se ve en novillas seropositivas y su descendencia. En otros hospedadores intermediarios determinados están; la cabra (Barr *et al.*, 1992; Dubey *et al.*, 1996), la oveja (Dubey y Lindsay, 1990), el caballo (Lindsay *et al.*, 1996b) y en el camello (Hilali *et al.*, 1998). En animales silvestres, la infección ha sido detectada en el ciervo (Gondim *et al.*, 2004a), zorro (Jakubek *et al.*, 2001), dingo (Barber *et al.*, 1997b) felinos salvajes (Cheadle *et al.*, 1999b) y el rinoceronte (Williams *et al.*, 2002). La infección experimental ha sido establecida en diversas especies de pájaros (Baker *et al.*, 1995). El papel de cada una de estas especies hospedadoras en el ciclo biológico del parásito y su importancia en relación con la transmisión de la infección hasta la actualidad no están totalmente aclarados.

2.5.2.2. Edad.

Los perros de cualquier edad pueden desarrollar neosporosis. Los casos reportados han ocurrido en perros jóvenes desde dos días de edad hasta los 14 años (Barber y Trees, 1996; Cantile y Arispeci, 2002; Hoskins *et al.*, 1991; Lorenzo *et al.*, 2002). Sin embargo, los estudios realizados por Wouda *et al.* (1999) y Basso *et al.* (2001b) demostraron que la prevalencia aumentaba conforme avanzaba la edad del animal que vivían en áreas rurales y sobre todo aquellos que habitaban conjuntamente con el ganado vacuno.

2.5.2.3. Raza y Sexo.

Cualquier raza de perro puede afectarse. La neosporosis se ha reportado en más de 30 razas, incluye así; Yorkshire Terrier, Gran Danes, Border Collie, Husky, Labradores, Boxer. Los casos registrados corresponden a caninos domésticos que viven en áreas urbanas y rurales. No se ha encontrado predilección por sexo (Dubey y Lindsay, 1996).

2.5.2.4. El Parásito.

Dentro de los factores dependientes del parásito que pueden influir en el desarrollo de la infección destacan el aislado de *N. caninum*, la dosis infectante, el

estadío parasitario y la presencia de infecciones concurrentes (Dubey, 2003). Experimentalmente, se ha logrado transmitir por diferentes vías: intramuscular, subcutánea, intravenosa, intraperitoneal, calostrálica y oral, y todas las evidencias sugieren que la vía transplacentaria es el principal modo de contagio (Ortega-Mora *et al.*, 2001, Uggla *et al.*, 1998).

2.5.2.5. Medio Ambiente.

La información sobre los factores medio ambientales que pueden predisponer a la infección por *Neospora caninum* es escasa. En el caso de *Toxoplasma*, la humedad es un factor muy importante para la evolución y sobrevivencia de los ooquistes infectivos, siendo, por lo tanto, los dormitorios húmedos y permanentemente utilizados, especialmente en época de lluvia, una excelente fuente de infección para los camélidos (Rojas, 2004). En el caso de *Neospora caninum*, los estudios han demostrado que las infecciones postnatales y los abortos se presentan con mayor frecuencia durante la época de otoño e invierno, debido probablemente a que la viabilidad de los ooquistes en el medio disminuiría durante la estación seca y cálida (Ortega-Mora *et al.*, 2001).

Los ooquistes eliminados en las heces, se vuelven infectivos al esporular en el medio ambiente entre 48 a 72 horas (Lindsay *et al.*, 2001) y los quistes tisulares pueden sobrevivir hasta 14 días a 4°C. Sin embargo, los bradizoítos conservados en tejido nervioso a -20°C mueren transcurridas 24 horas (Lindsay *et al.*, 1992).

2.6. Patogenia.

Una vez en el organismo, *N. caninum* realiza la invasión mediante un proceso activo en el cual intervienen procesos de motilidad, adhesión a moléculas de superficie y penetración en la célula hospedadora (Álvarez *et al.*, 2003). Los taquizoítos se adhieren a las células diana a través de los proteoglicanos de superficie (Naguleswaran *et al.*, 2001) y posteriormente las invaden, rodeándose de la membrana plasmática de la célula hospedadora (vacuola parasitófora), localizándose intracitoplasmáticamente en los cinco primeros minutos (Ortega-Mora *et al.*, 2001). Luego se da la multiplicación activa, ocasiona la destrucción de la célula, con la aparición de focos de necrosis, que es la

principal manifestación lesional, la respuesta inflamatoria no es purulenta y está constituida por macrófagos, linfocitos y células plasmáticas. Asimismo, si el proceso perdura en el tiempo, puede tener lugar una proliferación de tejido conjuntivo en esa zona (Barr *et al.*, 1991a)

Aunque se conoce que el aborto puede presentarse entre los tres y nueve meses de gestación, antes de esa fecha probablemente se acompañan de reabsorción. Además, los fetos abortados, frecuentemente autolíticos, no suelen presentar lesiones macroscópicas características y no hay retención de placenta. Siendo un hallazgo clínico característico en los brotes de aborto por neosporosis, el cual es abortado o bien retenido hasta el final de la gestación (Buxton *et al.*, 2002). El aborto originado por *N. caninum*, se produce luego de una parasitemia de la madre con una posterior invasión de las células en el útero grávido por parte del parásito y un posible daño a la placenta; aunque, tan solo una minoría de los fetos infectados presentan como consecuencia una infección letal. Esta situación se presenta en el caso de que la madre se infecte por primera vez, mediante la ingestión de ooquistes o tras una recrudescencia de una infección previa. (Innes *et al.*, 2002).

Los factores que pueden conducir al desarrollo de la enfermedad son diversos: como el momento de la gestación en el que se produce la parasitemia (Buxton *et al.*, 2002). El aborto depende de la cantidad y duración de la parasitemia la eficacia de la respuesta inmune maternal, la capacidad del feto para desarrollar una respuesta inmune y las características del aislado de *N. caninum* (Innes *et al.*, 2002). Estos factores se han obtenidos tanto en infecciones naturales (Barr *et al.*, 1991b), como en infecciones experimentales (Williams *et al.*, 2000).

El feto durante sus etapas de desarrollo, es especialmente vulnerable durante el primer tercio de gestación, debido a la inmadurez de su sistema inmune. Durante el tercio medio de gestación, estos tejidos empiezan a reconocer y a responder frente a los microorganismos, por consiguiente antes de los 100 días de gestación el feto es incapaz de reconocer un patógeno. Entre los días 100 y 150 de gestación el feto comienza a desarrollar una respuesta inmune y después del día 150 el feto progresivamente es cada vez más inmunocompetente (Buxton *et al.*, 2002). En el segundo tercio de gestación,

ocurren la mayoría de los abortos debido que el feto desarrolla una respuesta inmune rudimentaria e insuficiente para superar la infección (González *et al.*, 1999). Finalmente, la infección del ganado al final de la gestación tiene como resultado el nacimiento de terneros congénitamente infectados pero clínicamente sanos, debido a que el feto es capaz de desarrollar una defensa competente frente al patógeno. En definitiva, el éxito de la infección por el parásito también está en función de la adecuación de la respuesta inmune del hospedador.

Cuando *N. caninum* invade las células en el útero bovino se multiplica y causa la destrucción focal del tejido tanto materno como fetal de la placenta, iniciando a su vez una respuesta inflamatoria. A partir de esta zona el daño se extiende a la membrana corioalantoidea entre los cotiledones (Buxton *et al.*, 2002). Simultáneamente al daño y la respuesta inflamatoria en la placenta, el parásito ingresa en la corriente sanguínea del feto e invade diversos tejidos como corazón, hígado, músculo esquelético y pulmón, mostrando una especial predilección por el sistema nervioso central (SNC), siendo en este órgano y alrededor de los capilares, donde el parásito se localiza en las fases iniciales (Buxton *et al.*, 1998).

La infección congénita subclínica parece ser frecuente, con el nacimiento de terneros clínicamente sanos. En estos animales asintomáticos, la infección intrauterina, induce en fetos inmunocompetentes la producción de títulos elevados de anticuerpos específicos precalostrales, reportándose que hasta un 95% de los terneros infectados congénitamente pueden nacer clínicamente normales, y a su vez, pueden transmitir la infección a su descendencia. De este modo el parásito puede persistir durante muchos años en un rebaño infectado sin que sea necesaria la intervención del hospedador definitivo (Quintanilla, 1999).

2.7. Inmunidad.

2.7.1. Respuesta Inmune Celular.

Las primeras células del sistema inmune que actúan frente a *N. caninum*, se tiene a las células presentadoras de antígeno como pueden ser los macrófagos, NK y las

células dendríticas, que responden a la infección liberando citoquinas como la interleukina 12 (IL-12), el gamma-interferón γ -IFN y el factor de necrosis tumoral (TNF), y junto a los linfocitos CD4+ y CD8+, intervienen en la regulación del balance de respuesta celular Th1/Th2, que es crucial en la respuesta protectora desarrollada frente al parásito (Mineo y Machado, 2005). Los estudios preliminares, demuestran que γ -IFN puede jugar un papel importante, debido que el tratamiento de cultivos celulares de taquizoitos con γ -IFN reduce significativamente la multiplicación del parásito (Innes *et al.*, 1995). Así mismo, la estimulación *in vitro* de linfocitos de novillas infectadas experimentalmente con antígenos de taquizoitos estimula una respuesta proliferativa a partir del día 8 post infección, que se mantiene al menos 77 días (Lunden *et al.*, 1998).

El γ -IFN y la IL-12, los cuales son responsables de una respuesta de tipo Th1, y estarían implicadas en el control de la neosporosis aguda (Baszler *et al.*, 1999). Además, también se ha descrito un efecto sinérgico entre el γ -IFN y el TNF (Quintanilla, 1999). Finalmente, se han descrito otras dos linfoquinas, la IL-10 y la IL-4. La IL-10 se ha detectado en ratones infectados experimentalmente a los 10 días post infección, pero se desconoce su papel en la respuesta inmune (Kasper y Khan, 1998). Sin embargo, la IL-4 está relacionada con una respuesta de tipo Th2, y con el progreso de la enfermedad, por ello una posible estrategia para disminuir la transmisión congénita es neutralizar la producción de IL-4 (Long y Baszler, 2000) favoreciendo de esta forma la producción de IL-12 y γ -IFN relacionados con una respuesta de tipo Th1.

En cuanto a las poblaciones de linfocitos que responden a la estimulación frente al parásito, los datos obtenidos en los diferentes estudios apuntan la importancia de las células T tanto CD4+ como CD8+. Las células T CD8+ son parcialmente responsables de la protección frente a *N. caninum*, al contrario que en *T. gondii* donde las CD8+ juegan un papel esencial en la protección comparado con las CD4+ (Mineo y Machado, 2005).

2.7.2. Respuesta Inmune Humoral.

De acuerdo con las observaciones de Innes *et al.* (2001) la inmunidad que se desarrolla en respuesta a una exposición primaria a *N. caninum* es insuficiente para

prevenir la transmisión vertical del parásito (de la madre al feto). Sin embargo, los animales con infecciones crónicas desarrollan una fuerte inmunidad celular y humoral que les protege de posteriores abortos y evita la transmisión congénita, tal y como se ha descrito en los trabajos realizados por Williams *et al.* (2000) e Innes *et al.* (2001).

Por lo tanto, la respuesta inmune maternal tiene influencia sobre la infección congénita y el aborto. Además, la adquisición de la infección durante la gestación necesariamente no conlleva al aborto o a la transmisión congénita. Por otra parte, en los rebaños que presentan aborto endémico se han detectado fluctuaciones en los niveles de anticuerpos a lo largo de la gestación. Porque las reproductoras seropositivas tienen un riesgo de abortar dos veces superior al de reproductoras seronegativas. Además, las reproductoras que presentan títulos elevados de anticuerpos entre los días 180 y 210, tienen mayor probabilidad de abortar, mientras que las que presentan elevados títulos de anticuerpos, alrededor del día 240 de gestación, tendrán mayor probabilidad de tener terneros seropositivos a los nacimientos (Williams *et al.*, 2000). Estas fluctuaciones de los títulos de anticuerpos en los animales con infección natural, implican una alteración del estado serológico del individuo con el paso del tiempo, pasando a ser seronegativos muchos animales seropositivos a lo largo de la gestación (Quintanilla *et al.*, 2000).

En novillas infectadas experimentalmente, mediante inoculación intravenosa del parásito, se detectaron IgM específicas a partir del día 12 pos infección. La respuesta de IgG1 e IgG2 es más tardía, detectándose a partir del día 29 post infección, y presentando un máximo el día 35 post infección., en el estudio realizado por Quintanilla *et al.* (2000). Por otra parte, existe una relación entre las fluctuaciones de anticuerpos detectadas a lo largo de la gestación y la transmisión congénita. Según lo indican en el estudio de Pereira-Bueno *et al.* (2000), quienes encontraron una asociación significativa entre el aumento del título de anticuerpos en el sexto mes de gestación, el cual se mantiene hasta el momento del parto, y el nacimiento de terneros congénitamente infectados.

2.8. Signos Clínicos:

La mayoría de la sintomatología es subclínica.

2.8.1. Neosporosis en Caninos.

El curso de la enfermedad es variable, puede ser agudo; se observa la muerte a la semana de presentarse los primeros síntomas, y otros de curso crónico; donde los síntomas se muestran progresivamente (Barber, 1998). Los signos iniciales que puede percibir el dueño es una ligera depresión y tremor facial y ataxia que va del miembro pélvico al miembro anterior y la forma de caminar con ambos miembros posteriores a la vez (salto de conejo), caminar en cuclillas (Dubey y Lindsay, 1996; Cantile y Arispici, 2002).

La parálisis del miembro posterior es progresiva y puede ser unilateral o bilateral, avanzando a una parálisis total con atrofia muscular que puede ser flácida o espástica, y en la mitad de los casos puede haber una hiperextensión rígida de uno o ambos miembros posteriores sobre todo en perros juveniles (Barber y Trees, 1996; Barber, 1998). La parálisis del miembro anterior implica además, alteración de los reflejos oculares (reflejo de la pupila inactiva, anisocoria, nistagmo), incapacidad para abrir o cerrar la quijada, dificultad para comer, disnea, hasta un paro cardíaco (Dubey y Lindsay, 1996; Barber y Trees, 1996; Basso *et al.*, 2005).

La fiebre y la inapetencia no es frecuente; los perros se muestran alertas hasta el final de la sintomatología; así mismo, se presentan sintomatología poco común como neumonía intersticial, pancreatitis, hepatitis, dermatitis (ulceras cutáneas focales), megaesófago y problemas digestivos (Barber, 1998). Las lesiones cutáneas se desarrolla con múltiples nódulos y ulceras focales que puede medir de 0.5 – 5 cm de diámetro de distribución variable; además, en estas lesiones mediante biopsia y aspiración se pudo observa la presencia de taquizoitos y mediante cortes histológicos se observo inflamación necrotizante, pero se reporta que las lesiones cutáneas se deba a una inmunosupresión del animal como lo confirma Boyd *et al.*, (2005), además las lesiones dermales se reporta mas en perros adulto que en perros juveniles.

2.8.2. Neosporosis en Bovinos.

En el ganado bovino el aborto puede producirse entre el tercer y el noveno mes de gestación con una media en torno a los 5 - 6 meses de gestación. Las momificaciones es uno de los hallazgos clínicos que se observa con frecuencia, así como, muerte fetal, reabsorción, autólisis, nacidos enfermos, nacidos aparentemente normales pero crónicamente afectados. Las lesiones se dan más en el SNC, hígado, músculo esquelético. Las lesiones graves son raras pero pueden observarse en el corazón, músculo esquelético y el cerebro. (Dubey y Lindsay, 1996).

En un estudio realizado en 82 fetos se observó en un 100 % encefalitis y miositis seguido de adrenalitis, miositis, nefritis, hepatitis, placentitis y neumonía. La lesión miocardial puede presentar autólisis y las lesiones hepáticas consisten en una infiltración periportal de células mononucleadas y focos de necrosis hepatocelular (Barr *et al.*, 1991a).

Los terneros afectados pueden presentar signos neurológicos o no y ser aparentemente normales. En los terneros infectados que nacen vivos, las principales manifestaciones son de tipo neuromuscular, estos signos clínicos se observan entre los 3 a 5 días después del parto aunque pueden aparecer incluso transcurridas dos semanas. Los terneros pueden nacer con menor peso de lo normal, débiles e incapaces de levantarse (Ortega-Mora *et al.*, 1997). Las extremidades anteriores y posteriores pueden presentar flexión o hiperextensión, los signos neurológicos pueden revelar ataxia, reflejo patelar decreciente, reflejo retrospectivo lento también puede presentar exoftalmia y asimetría ocular aparente (Dubey y Lindsay, 1996).

2.8.3. Neosporosis en Ovinos y Cabras.

Actualmente, la mayor parte de la información procede de infecciones experimentales. Hasta el momento solo se ha reportado un caso de Neosporosis congénita en un cordero con una sintomatología similar a la que se observa en terneros recién nacidos. (Ortega-Mora *et al.*, 1997), pero sí existen reportes de abortos en cabras

causado por *Neospora caninum*. También se ha reportado el nacimiento de crías muertas o débiles (Barr *et al.*, 1992).

En las infecciones experimentales, se ha comprobado que el momento de la gestación en que tiene lugar la infección es determinante para la presentación de abortos o mortinatos. En un estudio en ovinos, todos los animales infectados a los dos meses de gestación abortaron. De los animales infectados a los tres meses una porción abortó y otras parieron corderos débiles y unos cuantos corderos normales. De los infectados a los 4 meses, ninguno abortó y los corderos nacieron aparentemente normales. Todas las ovejas desarrollaron elevados títulos de anticuerpos (Ortega-Mora *et al.*, 1997).

En el caso de las cabras una infección temprana cursa con muerte y reabsorción fetal o expulsión de fetos con autólisis. Una infección media da cabritos normales con infección subclínica en algunos casos da mortinatos. La infección en la última fase da lugar a nacimientos de cabritos débiles que fallecen a los pocos días. En los fetos los hallazgos histológicos han sido muy semejantes a los encontrados en terneros (Ortega-Mora *et al.*, 1997).

2.8.4. Neosporosis en Equinos.

Neospora hughesi es considerada como causante de mieloencefalitis equina (Marsk *et al.*, 1999). En Italia se realizó un estudio con 116 equinos mediante la técnica de IFI, se detecta anticuerpos contra *Neospora caninum* en un 28 % de los equinos (42/116) sin observarse signos clínicos de la enfermedad (Ciaramella *et al.*, 2004).

2.8.5. Neosporosis en Camélidos Sudamericanos (CSA).

Se han realizado estudios sobre la prevalencia de *N. caninum* en diversas partes del Perú, hallando prevalencias de 42.4% en alpacas y 18.4% en llamas que evidencia la presencia del parásito pero no asegura la relación con los problemas reproductivos y entre estos al aborto que se presentan en la especie (Chávez *et al.*, 2002). Así mismo Moya *et al.* (2003) reportó 16.72% en llamas de la provincia de Melgar-Puno.

2.9. Lesiones.

Las lesiones dependen de la ruta de infección del parásito y la presencia de inmunosupresión del hospedador.

2.9.1. Lesiones Histopatológicas.

Se observa una inflamación severa en el cerebro y la médula espinal (SNC), la inflamación en el cerebro se distribuye en un patrón multifocal y las lesiones severas pueden tener un área central de necrosis y atrofia. Hay a menudo una meningitis, leptomeninges o meningoencefalomielitis no supurativa multifocal, además, se observa gliosis focal asociado a cuadros de malacia sobre todo alrededor de los quistes tisulares (McAllister, 2005; Cantile y Arispici, 2002).

Las lesiones predominantes son una miositis necrotizante multifocal del músculo cardíaco y esquelético, severa dermatitis ulcerativa piogranulomatosa multifocal. Además, una pancreatitis necrotizante multifocal, a nivel intestinal a nivel de las placas de peyer y una depleción linfocítica (Boyd *et al.*, 2005). A nivel del pulmón se observa necrosis focal con exudado fibrinoso e infiltración de células inflamatorias y en algunos alvéolos se observa hiperplasia del epitelio, en el hígado se aprecia un edema portal, con degeneración hidropica y necrosis, nefritis intersticial focal, así mismo, dermatitis con presencia de úlceras cutáneas focales o multifocal (Barber, 1998; Basso *et al.*, 2005; McAllister, 2005).

En terneros a nivel del cerebro, microscópicamente puede observarse zonas pálidas a oscuras y focos de necrosis. Estas lesiones neuronales consisten en encefalomielitis no supurativa caracterizada por ser multifocal a difusa a nivel de meninges y ocasionalmente con calcificación. La lesión característica en el SNC es una necrosis rodeada por infiltración de células mononucleadas, la proliferación de glías se ha visto más en fetos abortados en tercer trimestre.

2.10. Importancia Económica.

La neosporosis producida por *Neospora caninum* es conocida como agente causal de importantes pérdidas económicas en la industria ganadera y la cárnica. Es considerada en la actualidad, como una de las enfermedades causantes de aborto con alta prevalencia en el rebaño (Anderson *et al.*, 1997).

En California, con 1,2 millones de cabezas de ganado lechero y una tasa de aborto del 12%, considerando que la infección por *N. caninum* es responsable de aproximadamente el 43% del total de abortos y que cada aborto supone una pérdida de entre 550 y 600 dólares americanos para la explotación, el costo económico de la neosporosis en el sector lechero se ha estimado en unos 34-35 millones de dólares anuales (Dubey, 1999). En Australia, aproximadamente el 25% de los abortos diagnosticados son atribuidos a la infección por *N. caninum* y, por ello, la neosporosis está considerada como una de las causas más importantes de pérdidas económicas, tanto en la industria lechera como en el sector cárnico (Britlain, 2000).

Las pérdidas económicas originadas por la neosporosis están asociadas al fallo reproductivo. Aunque el aborto se ha considerado como el efecto más adverso de la neosporosis también hay que tener en cuenta otros efectos negativos, tales como la disminución en la producción de leche en los animales seropositivos, el acortamiento de su vida productiva, la infertilidad asociada a mortalidad fetal y reabsorciones, la mortalidad neonatal y el nacimiento de terneros congénitamente infectados con o sin sintomatología clínica (Thumond y Hietala, 1997a; Thumond y Hietala, 1997b).

Por otra parte, en el análisis económico sobre los efectos de la infección por *Neospora* en un centro de producción es la disminución del valor de la reposición y el costo del sacrificio prematuro de los animales infectados. Se calcula que el riesgo de aborto en los animales seropositivos es de 2 a 3 veces mayor al riesgo de aborto en los animales seronegativos en las explotaciones con aborto endémico, pero puede ser mucho más alto en las explotaciones con brotes de aborto epidémico, siendo las hembras primíparas las que presentan una mayor probabilidad de abortar. (Anderson *et al.*, 1997; Moore *et al.*, 2001).

2. 11. Salud publica.

En los años 1998 y 1999 se realizaron dos estudios sobre la presencia de *Neospora caninum* en humanos, utilizando técnicas de diagnostico ELISA, IFI e Inmunoblot, los resultados fueron negativos; ningún paciente fue seropositivo al parásito (Nam *et al.*, 1998; Petersen *et al.*, 1999). Además en el año 1999 se halla seropositividad baja en humanos mediante Inmunoblot (Tranas *et al.*, 1999), y en el año 2005 se realiza un estudio en pacientes seropositivos y negativos a *Toxoplasma gondii*, así mismo asociados a otros signos clínicos, divididos en cuatro grupos; 61 pacientes VIH positivos, 50 pacientes con desordenes nerviosos, 91 pacientes recién nacidos y 54 pacientes aparentemente sanos; Todos los pacientes fueron evaluados bajo las técnicas de ELISA, IFI e Inmunoblot. La mayor seropositividad a *Neospora caninum* se observó en pacientes positivos a *Toxoplasma gondii* y pertenecientes a los dos primeros grupos; VIH (38%) y signos nerviosos (18%). La seropositividad confirmada por inmunoblot fue reconocida por el antígeno 29 kDa. Y se concluye la presencia de *Neospora caninum* en pacientes inmunocomprometidos (Lobato *et al.*, 2006).

2.12. Diagnostico.

2.12.1 Examen Histopatológico.

El examen histopatológico se puede realizar en los tejidos de fetos abortados. Las muestras para remitir al laboratorio son cerebro, pulmones, corazón, hígado, esófago, intestino, bazo, nódulos linfáticos, páncreas, el riñón y el músculo estriado que serán fijados en formalina al 10%. Y estas muestras ya fijadas en parafina y luego teñidas con Hematoxilina-Eosina (H-E) y examinado al microscopio (Basso *et al.*, 2005).

En una neosporosis los quistes tisulares se pueden ubicar en cualquier área del cerebro y el corazón. En el cerebro se observan lesiones características en el tronco encefálico y los pedúnculos cerebelosos, así como necrosis focal y microgliosis dispersa que comprenden los nódulos. La microgliosis dispersa se observa en la corteza particularmente en las zonas adyacentes a los vasos sanguíneos de la interfase de la materia gris y blanca. En el corazón, hay un infiltrado celular mononuclear en el

pericardio, miocardio y endocardio, con necrosis multifocal asociada con una leve mineralización y definida como una miocarditis no supurativa (Boulton *et al.*, 1995).

2.12.2. Inmunohistoquímica.

Las técnicas Inmunohistoquímicas permiten la confirmación de *N. caninum* en los cortes de tejido utilizando un suero policlonal o un anticuerpo monoclonal anti-*Neospora* (Lindsay y Dubey, 1989a). En ocasiones, se han observado variaciones considerables en la reacción del antisuero en dependencia del tipo de antígeno, el estado del parásito usado para inmunizar al conejo y la fijación de los antígenos parasitarios por lo cual, en los últimos años, se han utilizado preferentemente anticuerpos monoclonales en las pruebas Inmunohistoquímicas (Ortega- Mora *et al.*, 1997).

Actualmente, en la práctica diaria, se analizan por técnicas Inmunohistoquímicas basadas en el uso del complejo Avidina-Biotina-Peroxidasa (ABC) los tejidos fetales que presentan “lesiones compatibles” en el examen histológico convencional con el fin de confirmar la presencia de restos de antígeno, taquizoítos enteros o quistes con bradizoítos en los tejidos afectados. Hay que tener en cuenta que la sensibilidad de las técnicas histológicas utilizadas con fines diagnósticos puede variar en función del número de cortes histológicos analizados y del grado de autolisis de los tejidos (Barr *et al.*, 1995).

2.12.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa.

La técnica de PCR se basa en la identificación de algún segmento de ADN que se halla presente en todos los estadios del ciclo biológico y que permite diferenciar a *Neospora caninum* de otros protozoos (Howe y Sibley, 1999). A la vez ha permitido un gran avance en el diagnóstico de las enfermedades infecciosas por ser extremadamente sensible y específica. Según un estudio que comparaba las técnicas de IHC y PCR en 7 laboratorios se demostró que PCR es un método altamente sensible (76-100 %) y específico (83-96 %) frente a IHC con una sensibilidad variable (41-100 %) y especificidad (79-100) (Maanen *et al.*, 2004).

En la actualidad, las técnicas de PCR que se han desarrollado han sido utilizadas no solo en el diagnóstico de la infección, sino también en el estudio de la patogenia de la enfermedad, en los cuales la técnica de PCR se ha combinado con otras técnicas como el

RFLP y el RAPD. Recientemente, el desarrollo en paralelo de dos técnicas de PCR cuantitativa permite no solo la detección sino también la cuantificación del DNA del parásito en los tejidos de animales infectados (Collantes-Fernández *et al.*, 2002; Müller *et al.*, 2002).

2.12.4. Inmunofluorescencia Indirecta (IFI).

Detecta, fundamentalmente anticuerpos que se unen a los antígenos localizados en la superficie celular de *N. caninum*. Se considera como resultado positivo cuando se observa la fluorescencia en toda la superficie del taquizoíto sueros con títulos moderados o altos. En resultados negativos la fluorescencia va quedando restringida a la parte apical del taquizoíto cuando se analizan sueros con títulos bajos. Sin embargo, estos resultados deberían interpretarse con cuidado, ya que la fluorescencia apical también puede aparecer como resultado de reacciones cruzadas con *T. gondii*, ya que *Eimeria* spp, *T. gondii* y *N. caninum* contienen epítomos comunes (Sasai *et al.*, 1998)

En la IFI se ha empleado como antígeno taquizoítos de *N. caninum* de aislados de origen bovino y canino, no existiendo evidencias de que las posibles diferencias antigénicas entre los diferentes aislados puedan afectar a la precisión de la prueba. Esta técnica serológica se ha empleado fundamentalmente en estudios epidemiológicos para detectar anticuerpos anti *N. caninum* en un gran número de especies animales, incluyendo al perro, zorro, gato, ganado bovino, cabras, ovejas, diversas especies de roedores y primates. Así mismo, la IFI ha sido considerada como la técnica de referencia (gold standard) en la neosporosis, con la cual han sido comparadas otras técnicas serológicas (Alvarez, 2003).

2.12.5. Inmunoabsorción Ligada a Enzimas.

Se han desarrollado numerosas pruebas de ELISA para la detección de anticuerpos específicos, cuya sensibilidad y especificidad son adecuadas; sencillas y rápidas de realizar y la interpretación de los resultados es fácil. Estas pruebas utilizan distintos tipos de antígenos: taquizoítos sonicados, taquizoítos fijados con formalina, antígenos recombinantes o antígenos incluidos en partículas iscom (William *et al.*, 1997).

ELISA indirecto que emplea antígeno soluble mezcla de antígenos intracelulares y de membrana de los diferentes aislados de *N. caninum* BPA1 y NC-1 es la técnica diagnóstica que se emplea con mayor frecuencia en la detección de anticuerpos específicos en suero y líquidos fetales (Björkman y Uggla, 1999). Una variante de los ELISAs convencionales que emplean antígeno soluble de taquizoítos es el ELISA de competición. El ELISA de competición es una prueba indirecta en la cual se incluye el empleo de un anticuerpo monoclonal que compite con los anticuerpos específicos del suero problema por los epítomos disponibles del antígeno fijado en la placa.

El ELISA basado en partículas “iscoms” se utilizó por primera vez para diagnosticar la infección en el perro. Las partículas “iscoms” son estructuras de aproximadamente 40 nm compuestas por Quil A, colesterol, fosfolípidos y a las que se añade el antígeno, el cual incluye un número limitado de proteínas de membrana de origen citoplasmático de *N. caninum*. Las partículas iscoms permiten seleccionar antígenos anfipáticos, como las proteínas de membrana de los taquizoítos localizadas en los compartimentos intracelulares y de la superficie celular. En el desarrollo de este ELISA se han incluido antígenos del aislado NC-1 de 18, 30-45 y 61 kDa. (Björkman *et al.*, 1994).

2.12.6. Aglutinación Directa.

La Aglutinación Directa (HIA) se basa en la capacidad de aglutinación de los taquizoítos formolizados en presencia de inmunoglobulinas específicas. La prueba, ha incluido una modificación en la cual únicamente se detectan IgG mientras que las IgM son destruidas mediante un tratamiento con mercaptoetanol. En esta técnica de aglutinación directa modificada se basan las pruebas diseñadas para el diagnóstico de la infección por *Neospora* (Romand *et al.*, 1998; Packham *et al.*, 1998). La prueba ha demostrado ser bastante específica y en su desarrollo se han empleado los aislados de *N. caninum* BPA-1 (Packham *et al.*, 1998) y Nc-1 (Romand *et al.*, 1998), obteniéndose en ambos casos una sensibilidad elevada cuando se analizaron sueros de 16 especies diferentes (Packham *et al.*, 1998).

HIA modificado resulta ser una prueba con una alta sensibilidad y especificidad contra anticuerpos de la especie bovina. Sin embargo, como otras pruebas serológicas,

su aplicación en diversos huéspedes debe ser evaluada cuidadosamente (Bjorkman y Uggla, 1999).

2.12.7. Inmunoelectrotransferencia (Western blot o Western blotting).

Esta técnica, se emplea como apoyo a otras pruebas serológicas, más que como una técnica rutinaria de diagnóstico en la neosporosis, empleándose como prueba de investigación, junto con otras técnicas serológicas (IFI y ELISA) para establecer valores de concordancia y puntos de corte. Estos estudios recientes proponen al western blot como técnica de referencia de la neosporosis en sustitución de IFI, debido a su mayor sensibilidad sin que conlleve un descenso de la especificidad (Schares *et al.*, 1998).

La técnica de western blot se ha utilizado, fundamentalmente, para estudiar la composición antigénica de *N. caninum*, empleando sueros de diferentes especies infectadas. Entre los antígenos identificados destacan por su intensidad y frecuencia de reconocimiento varios antígenos inmunodominantes de 17, 29-30, 37 y 46 kDa (Bjerkas *et al.*, 1994).

2.13. Tratamiento.

En la actualidad, únicamente los perros con síntomas clínicos de neosporosis reciben tratamiento terapéutico. Los resultados con algunos de los fármacos ensayados en perros con problemas neurológicos compatibles con una neosporosis son controvertidos y no permiten establecer conclusiones.

Entre los fármacos probados en cultivo celular destacan la mayoría de las sulfonamidas (sulfadiazina, sulfadimetoxina, sulfameracina, sulfametacina, sulfaquinoxalina y el sulfatiazol), los inhibidores de la dihidrofolato reductasa/timidilato sintetasa DHFR/TS (diaveridina, metotrexato, oritoprim, pirimetamina y trimetoprim), los antibióticos ionóforos (lasalocid, maduramicina, monensina, narasin y salinomicina), los macrólidos (azitromicina, claritromicina y eritromicina), las tetraciclinas (doxiciclina y minociclina) y las lincosamidas (clindamicina en sales cloruro y fosfato y la lincomicina hidrocloreuro) (Lindsay y Dubey, 1989b; Lindsay *et al.*, 1994). A diferencia de lo que sucede con parásitos estrechamente relacionados con *Neospora* como *Eimeria*,

Isospora o *Toxoplasma*, las sulfonamidas ensayadas en taquizoítos en cultivo celular no presentan una adecuada eficacia. Todos los demás grupos farmacológicos analizados, parecen tener mayor eficacia que las sulfonamidas, con mejores resultados frente a los taquizoítos en cultivos celulares y presentando sinergismo en combinación con los inhibidores de la DHFR/TS (Lindsay *et al.*, 1996a).

Existen dos problemas importantes para dar un tratamiento eficaz contra el parásito. El primero es atacar directamente a los bradizoítos que se encuentran en los quistes tisulares y el segundo es el tiempo de retiro de la leche hasta la eliminación del fármaco (Barr *et al.*, 1997).

Gottstein *et al.* (2001) realizaron un estudio de dos drogas que pueden ser el tratamiento quimioterapéutico de elección a condición de que sean apropiadas y disponibles. El experimento se realizó en ratones para la evaluación de los medicamentos Toltrazuril y Ponazuril. Los ratones fueron infectados vía parenteral y la infección fue supervisada en tres niveles: clínico (síntomas), histológico-lesiones (Inmunohistoquímica) y el nivel molecular (PCR). Como resultado previnieron la formación de lesiones cerebrales en los animales tratados y en el análisis por PCR demostró que disminuyó la detectabilidad del DNA del parásito en 91 a 90% correspondiendo a Toltrazuril y Ponazuril. Otro estudio en terneros, basándose en el efecto positivo del toltrazuril- Toltrazuril-sulfone (Ponazuril) usado experimentalmente en ratones infectados, obtuvo resultados favorables. También se evaluaron los tres niveles y los resultados fueron muy similares. Como conclusión se demostró que este tratamiento puede ser aplicado como una alternativa de quimioterapia y a la vez para controlar la neosporosis bovina (Kritzner *et al.*, 2002).

2.14. Control y Prevención.

El control se debe basar en el manejo adecuado de los perros como del ganado. Así como, el manejo de los perros. El control a nivel de los hospedadores definitivos e intermediarios es de vital importancia dado que hasta el momento las vacunas en desarrollo aún muestran dificultades para inducir inmunidad protectora en el ganado (Rojas, 2004).

En vacas donde sí se ha diagnosticado que el aborto es causado por *Neospora caninum*, se debe empezar con la identificación de los animales, el aislamiento de las vacas con antecedentes de aborto la utilización de pruebas serológicas y la realización de exámenes para el feto abortado para identificar su seropositividad. Una buena medida de control debe iniciarse en determinar la prevalencia en el hato con un 10 % de las vacas sanas, paridas y en ordeño a fin de conocer el nivel de seropositividad y el riesgo de abortos (French *et al.*, 1999).

Se debe hacer una correcta y detallada identificación de las vacas abortadas seropositivas, así como de las terneras que hayan nacido anteriormente de esas vacas. El objetivo de esta identificación es para no utilizar estos animales en la reposición, puesto que las vaquillonas congénitamente infectadas tienen 7 veces más posibilidades de riesgo de aborto durante su primera preñez comparada con vaquillonas seronegativas (Anderson *et al.*, 1997).

La reposición de los animales se debe efectuar con terneras seronegativa para esto lo primordial es realizar una prueba serológica antes de la ingesta de calostro o a los 5-6 meses de vida del ternero cuando los anticuerpos calostrales maternos han desaparecido. Las terneras positivas deberán destinarse a engorde y su posterior sacrificio (French *et al.*, 1999).

Para evitar la transmisión vertical se debe impedir el acceso de perros a lugares destinados al depósito de alimento para el ganado (depósitos de granos, galpones, silos, etc.) y pastizales. Así mismo se debe realizar el examen serológico de los perros a fin de asegurar su negatividad. Por último, se debe evitar que los perros consuman material abortado (feto, placenta) y se les debe alimentar con carne vacuna previamente cocinada (French *et al.*, 1999).

En los últimos años se están usando las vacunas como medidas de control, para evitar la infección del ganado a través del consumo de ooquistes; y así, realizar el control selectivo de los animales, y realizar la transferencia embrionaria, y prevenir la transmisión del parásito a nuevas generaciones (Williams *et al.*, 2006). El producto comercial que está actualmente en el mercado se denomina: Bovilis® Neo vacuna para

uso en vacas gestantes sanas como auxiliar en la reducción del aborto causado por *Neospora caninum* que contiene protozoarios muertos de *Neospora caninum*, con SPUR[®] como adyuvante que contribuye a su alta inmunogenicidad y estabilidad. Y actualmente se desarrolla otra vacuna por Jung-Hwa *et al.* (2005), a base de antígeno recombinante NcSRS2 y NcDG1 en vitro y en vivo, los resultados ofrecen una nueva alternativa de prevención.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de Estudio.

3.1.1. Ubicación.

El muestreo se realizó en los meses de febrero a marzo del año 2004 en las zonas de producción: Accopujio, Alianza, Antacalla, San Francisco y Conchatanca pertenecientes a la empresa Rural Alianza. Las cuatro primeras zonas se ubican en el distrito de Nuñoa y Conchatanca en el distrito de Macusani, pertenecientes a las provincias de Melgar y Carabaya, respectivamente, departamento de Puno.

La “Rural Alianza”, es una Empresa de Propiedad Social, siendo una de las más destacadas en la crianza de alpacas y llamas a nivel mundial. Además se crían ovinos y bovinos. La empresa se ubica en la sierra sur del Perú, a una altitud que va de 3.970 a 5.200 m.s.n.m.; longitud este de 76 ° 12´ y longitud Sur de 11° 1´.

3.1.2. Animales.

Para el presente trabajo se colectaron muestras de suero de caninos mayores de cinco meses provenientes de las cinco zonas de producción de la empresa Rural Alianza. Se tomaron referencias individuales a todos los animales muestreados que comprendía información como edad, sexo y procedencia.

3.1.3. Clima.

Es una región de clima frío y seco, con una estación seca de Mayo - Agosto. La temperatura media oscila entre 0 y 15 ° C, observándose temperaturas máximas de 16.5 ° C y mínimas de -10 ° C (Junio- Agosto, en las zonas más altas), con una precipitación media anual que va de 250 a 500 mm. Las máximas precipitaciones se dan en los meses de verano (Moreno Terrazas *et al.*, 1998).

3.1.4. Pastizales.

La alimentación del ganado de la zona esta constituido por pastos naturales destacando las siguientes vegetaciones: Tolares (*Parasthrephia lepidophylla*, *Baccharis spp*), especies nativas como; queñua (*Polylepis*) y en las zonas inhóspitas la *Azotella yarita*. Así mismo en los pajanales existe una gran variedad de gramíneas de los géneros *Festuca*, *Calamagrostis*, *Poa*, *Carex*, *Bromas*, etc (Moreno Terrazas *et al.*, 1998).

3.2. Materiales.

3.2.1. Materiales de Apoyo.

- Vacutainers con capacidad de 10 ml.
- Aguja venoject de 21x1 ½
- Viales plásticos de 2 ml para conservar los sueros.
- Pipetas de plástico.
- Caja de tecnoport.
- Gradillas.
- Refrigerante.
- Alcohol al 96%
- Algodón
- Cinta para rotular (Masking tape)
- Centrifuga.
- Lapicero de tinta indeleble.

3.2.2. Material para la prueba de IFI.

- Antígeno de *Neospora caninum* (NC-1), Taquizoíto fijado en formalina.
- Anti Ig G1 canino marcado con Isotiocianato de Fluoresceína.
- Suero bovino hiperinmune Anti *Neospora caninum*- control positivo.
- Suero bovino negativo a anticuerpos contra *Neospora caninum*.
- Cámara húmeda.
- Recipiente de lavado.
- Agitador magnético (Stuart Scientific)
- Estufa “Gallenkamp” de 37° C.
- Microscopio de fluorescencia “Leica”.
- Micropipetas (10, 50 y 100 ul).
- Tips descartables para pipetas.
- Solución salina tamponeada con fosfato (PBS).
- Fluido de montaje (50% Glycerol-50% pH 9).

3.3 Diseño Estadístico.

3.3.1 Tamaño Muestral.

La población total de perros de la empresa Rural Alianza se estimó mediante el número de pastores por cada zona, debido a que cada pastor tiene a su cargo de 2 a 3 perros como máximo. Para determinar el tamaño muestral se usó la fórmula de población finita, considerando una prevalencia referencial de 19.35% (Cornejo *et al.*, 2004) y un nivel de confianza de 95 % (Daniel, 1996).

Fórmula:

$$n = \frac{N Z^2 p (1-p)}{d^2 (N-1) + Z^2 p (1-p)}$$

Donde:

$$N = 206.$$

$$Z = 1.96 \text{ (95 \% de confianza).}$$

$$p = 0.1935 \text{ (prevalencia referencial anterior a la enfermedad).}$$

$$q = 0.8065 \text{ (complemento de prevalencia referencial).}$$

$$d = 0.05 \text{ (Margen de error).}$$

El tamaño de la muestra calculado fue 112 animales, lo cual nos representa el número mínimo de animales a muestrear.

3.3.2. Estratificación de Muestras

Para una mejor estimación de la población de la zona de producción a muestrear, se estratificó el tamaño muestral, utilizando la siguiente fórmula de estratificación de muestras (Daniel, 1996).

Fórmula:

$$n_d = \frac{N_k (n)}{N}$$

Donde:

n_d = Tamaño de muestra por estrato.

N_k = Población por estrato.

N = Población total

n = Tamaño muestral.

Cuadro 1. Estratificación de los caninos según la población en cada zona de producción de la empresa Rural Alianza

Zona de Producción	Población Canina	Población Estratificada
Alianza	80	44
Antacalla	33	18
Accopujio	26	14
Conchatanca	52	28
San Francisco	15	8
Total	206	112

En términos generales se observa en el estudio que el tamaño muestral calculado fue de 112 animales. Sin embargo, se logró recolectar 122 muestras durante los meses de Febrero y Marzo del 2004, y el tamaño muestral se estratificó por la presencia de cinco zonas en la empresa Rural Alianza.

3.4. Recolección de Muestras.

La recolección de muestras se realizó en los meses de Febrero y Marzo del 2004. Se extrajo cinco mililitros de sangre de cada animal, por punción directa de la vena cefálica en tubos vacutainers estériles y luego fueron centrifugados para extraer el suero, los mismos que fueron depositados en crioviales estériles de 2 ml, debidamente identificados y luego almacenados en congelación a -20°C para su conservación hasta su procesamiento en el Laboratorio de Parasitología Veterinaria FMV-UNMSM.

3.5. Procesamiento de la Muestra.

Se realizó en el Laboratorio de Parasitología en la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM, donde se aplicó la prueba de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), se usó antígeno de *Neospora caninum* (Nc-1) proporcionado por la Universidad Complutense Madrid-España.

3.6. Desarrollo de la Técnica.

Las muestras recolectadas fueron sometidas a la prueba de IFI y se procedió de la siguiente manera:

- 1.- Se utilizaron láminas de Inmunofluorescencia de 12 hoyos. Cada hoyo contenía taquizoitos de *Neospora caninum* (NC-1) fijados.
- 2.- Se añadieron 10 ul de suero diluido 1:50 a cada hoyo. En los 5 primeros hoyos se colocan los sueros de referencia positivo y negativo y en el resto de hoyos se colocan los sueros problema.
- 3.- Luego se incubó en cámara húmeda en una estufa a 37 ° C durante 30 minutos.
- 4.- Después de la incubación los portaobjetos se lavaron en una cubeta con PBS, durante 10 minutos cada uno en agitación y por 2 veces.
- 5.- Luego los portaobjetos se secaron bien y se tuvo cuidado de dejar húmedo los pocillos.
- 6.- Se añadieron 10 ul de conjugado/ pocillo.
- 7.- Se repitió el paso N° 3.
- 8.- Repetir el paso N° 4 añadiendo un tercer lavado con PBS y el lavado con H₂O destilada también de 10 minutos.
- 9.- Se dejó secar los portaobjetos a temperatura ambiente y en oscuridad.
- 10.- Por último se puso unas gotas de glicerina tamponada y se colocó un cubreobjetos encima.
- 11.- Los portaobjetos se guardaron en oscuridad a 4° C hasta el momento de la lectura en el microscopio de fluorescencia con el objetivo de 40x.

Observación: Las preparaciones se pueden conservar a –20 ° C en oscuridad.

Interpretación:

- **Positivo:** Si se observa fluorescencia en todo el contorno del parásito.
- **Negativo:** Si no hay fluorescencia o ésta es parcial.

3.7. Análisis Estadístico.

Los resultados se expresan en porcentaje así como el intervalo de confianza y el nivel de confianza utilizado en la prueba es del 95 % de seguridad.

3.7.1. Prevalencia (P)

Determinado el número de muestras positivas, se cálculo la prevalencia de *Neospora caninum* de las zonas de producción de la empresa Rural Alianza bajo la siguiente fórmula (Thrusfield, 1990):

Formula:

$$P = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ muestras positivas}}{\text{N}^{\circ} \text{ total de muestras.}} \times 100$$

3.7.2. Intervalo de confianza (IC)

Se estimó mediante la fórmula (Armitage *et al*, 1997):

Formula:

$$IC = P \pm Z \sqrt{\frac{p q}{n}}$$

Donde:

p = Prevalencia (14.75%).

q = 1 – p.

Z = 95 % de nivel de confianza (1.96).

n = Tamaño muestral (122).

3.7.4. Prueba de Chi² (X²).

La prueba de X² permitirá determinar si las variables edad y procedencia estan o no asociadas con la presentación de la infección por *N. caninum*.

IV. RESULTADOS

En el cuadro 2, se observa que la prevalencia de *Neospora caninum* en los 122 caninos procedentes de las zonas de producción: Alianza, Antacalla, Accopujio, ,Conchatanca y San Francisco pertenecientes a la empresa Rural Alianza, en el departamento de Puno, evaluados mediante la prueba de IFI mostró una prevalencia de $14.75 \pm 6.29 \%$ (18/122).

En el cuadro 3, se muestra los resultados de la frecuencia de *N. caninum* distribuidos según la edad, los animales menores de un año no presentaron anticuerpos contra *Neospora caninum*, siendo la frecuencia mas alta en el grupo de 1 a 7 años con 17.52%.

En el cuadro 4 se evalúa la variable sexo, donde los machos presentaron una mayor frecuencia (15.69%) con respecto a las hembras (10%).

Mediante la prueba de χ^2 no se observa asociación entre las variable lugar de procedencia, edad y sexo del perro con la presentación de la infección por *N. caninum*.

Cuadro 2. Frecuencia de *Neospora caninum* en perros pastores procedentes de cinco sectores de producción de la empresa Rural Alianza-Puno 2004.

Procedencia	Animales Muestreados	Animales Seropositivos	Frecuencia (%)
Alianza	38	3	7.89
Antacalla	19	1	5.26
Accopujio	17	3	17.65
Conchatanca	40	10	25.00
San Francisco	8	1	12.50
Total	122	18	14.75 ± 6.29

Cuadro 3. Frecuencia de *Neospora caninum* según estrato etareo en perros pastores de cinco sectores de producción de la empresa Rural Alianza-Puno 2004.

Estrato Etareo (Años)	Animales Muestreados	Animales Seropositivos	Frecuencia (%)
≤ 1	16	0	0
1 a 7	97	17	17.52
> 7	9	1	11.11

Cuadro 4. Frecuencia de *Neospora caninum* según sexo en perros pastores de cinco sectores de producción de la empresa Rural Alianza-Puno 2004.

Sexo	Animales Muestreados	Animales Seropositivos	Frecuencia (%)
Macho	102	16	15.69
Hembra	20	2	10

V. DISCUSIÓN

La neosporosis se ha convertido en una enfermedad emergente en diferentes partes del mundo. La especie más afectada es el vacuno, manifestando cuadros de abortos como signo clínico significativo (Schaes *et al.*, 1999). Su transmisión se mantiene principalmente por la vía vertical, además de la vía horizontal realizada por los caninos los que actúan como hospedador definitivo e intermediario. En la especie canina la enfermedad se puede manifestar con la presentación de cuadros clínicos neuromusculares en perros jóvenes y eventualmente por abortos en las hembras gestantes (Barber, 1998).

Se analizaron 122 sueros de perros de 5 zonas de producción (Alianza, Antacalla, Accopujio, Conchatanca y San Francisco) pertenecientes a la empresa Rural Alianza, en el departamento de Puno. La prevalencia de anticuerpos contra *N.caninum* fue de 14.75% (18/122) obtenidas mediante la prueba serologica de IFI. Este hallazgo nos indica que los animales estuvieron expuestos al parásito en algún momento de su vida, ya sea en la etapa pre o post natal.

Existen estudios similares realizados en caninos de otras zonas ganaderas del Perú que muestran prevalencias variables, así tenemos en el Valle de Lima con 32.7% (Del campo, *et al.*, 2003) y en la provincia de Chachapoyas con 28.87% (Horna *et al.*, 2003) y 19.4 % (24/124).en el Valle del Mantaro (Cornejo *et al.*, 2004). Al comparar los resultados obtenidos en el presente estudio, con los resultados antes mencionados demostrarían que la prevalencia hallada fue moderada, y que existen factores como la convivencia estrecha de los perros con el ganado, número de perros por pastor,

condiciones climáticas, que estarían involucrados para que la infección en la empresa Rural Alianza prevalezca.

La empresa Rural Alianza se dedica a la crianza de varias especies como: vacuno, ovinos, llamas y alpacas siendo este ultimo el predominante y de mayor importancia por ser una especie que se adapta a la zona donde abundan los pastos naturales. El Pastoreo de cada especie se realiza en un determinado territorio que esta limitada por barreras naturales; además, existen pastores para cada grupo de las diferentes especies, y cada pastor posee 2-3 perros pastores como máximo de diferentes edades, que se desplazan libremente, contaminando las pasturas con sus heces, que servirán de alimento para el ganado.

Los canidos evaluados en el estudio, provenían de zonas de producción de camélidos sudamericanos (alpacas y llamas), y al comparar este resultado con los obtenidos en ganado de la misma zona, por Moya *et al* (2003) en llamas, donde reportaron una prevalencia de 16.72 % (46/275) y por Atocsa *et al* (2005) en bovinos al pastoreo, donde encontraron 18.1% (76/419), cuyos valores son similares al encontrado en el presente estudio, siendo probable que los factores de riesgo para la adquisición de este parásito sean similares.

Las condiciones medioambientales en las zonas de producción de la empresa Rural Alianza no varían mucho lo que podría indicar que las diferencias encontradas se deban al azar. A diferencia de los estudios realizados por Cheadle *et al.* (1999a) y Wouda *et al.* (1999) en diferentes zonas geográficas, donde encuentran diferencias significativas en el porcentaje de infección, relacionándolo a las variaciones locales de temperatura. Además, Dubey y Lindsay (1996) demostraron que los quistes tisulares de *Neospora caninum* pueden sobrevivir por 14 días a 4°C mientras que a -20 °C solo son infectivos por un día.

Así mismo, al comparar los resultados de seroprevalencia a *N. caninum* realizados tanto en ganado al pastoreo como en sus perros pastores, ellos evidenciaron correlación, así en el valle de Lima, Del Campo *et al.* (2003) reportaron en caninos el 32.7% mientras que Silva *et al.* (2002) en ganado vacuno encontraron 29.6 %. Del mismo modo en Chachapoyas, Horna *et al.* (2003) encontraron en caninos 28.8%,

mientras que en bovinos Quevedo *et al.* (2003) hallaron 40.4%. Otros estudios de comparación en caninos procedentes de zonas urbanas y rurales encontraron un mayor predominio en estos últimos, sugiriendo una exposición postnatal al parásito (Basso *et al.*, 2001; Wouda *et al.*, 1999)

La variable procedencia se analizó en el cuadro 2, donde de los cinco sectores de producción evaluados se observa una frecuencia de infección mínima de 5.26% (1/19) correspondiente al sector Antacalla y una máxima de 25% (10/40) en Conchatanca. A pesar de la aparente amplia diferencia entre las áreas evaluadas, al análisis estadístico no se encontró asociación estadística alguna, debido a no existir una dispersión homogénea del número de perros por sector de producción, además en algunos sectores no se llegó a recolectar una mayor cantidad de muestras debido a la distancia, dificultad en el acceso a las zonas en estudio y la desconfianza de algunos pastores.

En el cuadro 3 se analizó la variable edad, clasificada según el grupo etareo, donde se encontró la mayor frecuencia de infección (17.52 %) en los animales de 1 a 7 años y la menor frecuencia (0%) en los animales menores de 1 año. No existió una dispersión homogénea del número de perros en cuanto a la edad por lo que la mayor población canina encontraba fue entre 1 a 7 años en la empresa Rural Alianza. Es por eso que, no se puede establecer que la tasa de infección aumenta según se incrementa la edad como si lo confirma los estudios realizados por Paré *et al.* (1998) y Basso *et al.* (2001), donde la seroprevalencia de *Neospora caninum* se incrementa con la edad.

En el cuadro 4 se evalúa la variable sexo, donde los machos presentaron una mayor frecuencia (15.69%) con respecto de las hembras (10%), sin embargo al análisis estadístico mediante Chi cuadrado no presentaron asociación con la presentación de infección contra *Neospora caninum*, esto puede verse afectado posiblemente por la mayor población de perros machos encontrado en el estudio. Además estudios anteriores muestran similares resultados y señalan que el sexo no representa un factor de riesgo para la adquisición de la infección. (Basso *et al.*, 2001; Del Campo *et al.*, 2003; Horna *et al.*, 2003 y Cornejo *et al.*, 2004).

Cabe resaltar que todos los sectores de producción tienen el mismo manejo de crianza extensiva, donde los pastores poseen una determinada cantidad de perros (2-3) que están en contacto directo con los camélidos. Por los estudios realizados, donde determinan al perro como hospedador definitivo y diseminador de la infección (McAllister *et al.*, 1998; Basso *et al.*, 2001a), al mantener la enfermedad por la vía de transmisión horizontal (Yaeger *et al.*, 1994; McAllister *et al.*, 1996; McAllister *et al.*, 2000), y que la existencia de 3 a más perros incrementa la seroprevalencia en un hato (Pare *et al.*, 1998) al diseminar al medio ambiente los ooquistes, confirmado por los estudios experimentales que demuestran que la ingestión de ooquistes de *N. caninum* a una dosis >1500 en el bovino, conducen al aborto si son administrados después del primer trimestre de gestación (Gondim *et al.*, 2004b), determinando así que es fundamental la presencia de al menos un canino en un centro de producción ganadera para la presentación de la enfermedad.

La presencia de la infección de neosporosis en los sectores de producción de la empresa Rural Alianza se debería a la forma de manejo de los animales, el pastoreo extensivo con la ayuda de los perros pastores los cuales se desplazan libremente ya que no cuentan con barreras físicas que limiten el acceso a las zonas de pastoreo del ganado facilitando el acceso a los probables abortos, descargas uterinas y placentas de los hospedadores intermediarios que posibilitaría su transmisión (Dijkstra *et al.*, 2002b), y por la crianza mixta de camélidos con otras especies como ovinos y bovinos, en estas especies, especialmente en bovinos se ha confirmado la transmisión de la enfermedad al introducir un perro infectado con el parásito, que infecta al ganado al liberar ooquistes al medio ambiente (Dijkstra *et al.*, 2002a).

La transmisión horizontal se efectúa al contaminar el agua y las pasturas con las heces infectadas con ooquistes de *Neospora caninum*. Así lo demuestran los trabajos realizados por Dijkstra *et al.* (2001), Dijkstra *et al.* (2002b), donde concluyen que la ingestión de restos fetales y placentarios de bovinos por el perro, ocasiona una infección postnatal del ganado por la liberación de ooquistes al medio ambiente (alimento, agua) perpetuando la presencia del parásito.

Otro factor a tomar en cuenta en esta zona altoandina es la presencia de hospedadores silvestres como es el zorro que llega hasta las puntas de parición; ya que es

posible la existencia de un ciclo de transmisión silvestre de *N. caninum* (Barling *et al.*, 2000), y en el estudio realizado por Gondim (2004a), confirma que el coyote (*Canis latrans*) y el ciervo (*Odocoileus virginianus*) están involucrados en el ciclo de vida de neosporosis, así mismo, el zorro podría también actuar como hospedador definitivo y contaminar las pasturas con heces infectadas con ooquistes, sin embargo hasta la fecha esta teoría no ha sido demostrada, debiéndose realizar mayores estudios para poder establecer otros hospedadores definitivos silvestres que estén involucrados en la transmisión de la neosporosis.

Por lo antes señalado, los resultados obtenidos confirman la presencia neosporosis canina en zonas del altiplano asociado a la crianza de CSA en la Empresa Rural Alianza, y la exposición a *Neospora caninum* de manera natural en alguna etapa de sus vidas, además de su aparente correlación con las prevalencias del ganado de la zona. Siendo necesario realizar más estudios que determinen la implicancia de *N. caninum* como causante de problemas reproductivos en CSA y la importancia del perro en la permanencia de la infección.

VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- La seroprevalencia de *N. caninum* en caninos de cinco sectores de producción ganadera de la empresa Rural Alianza fue moderada ($14.75 \pm 6.29\%$).
- La edad, sexo y procedencia (sector de producción) de los caninos infectados no muestran asociación con la posibilidad de adquirir *N. caninum*.
- Continuar con los estudios en el Perú que demuestren la importancia del canino doméstico y silvestre en la permanencia de la infección por *N. caninum*.

VII. BIBLIOGRAFIA

- 1 Álvarez, G.; F. Collantes; E. Costa; X. Rebordosa; L. Ortega-Mora. 2003. Influence of age and purpose for testing on the cut-off selection of serological methods in bovine neosporosis. *Vet. Res.* 34: 341–352.
- 2 Anderson, M.; J. Reynolds; J. Rowe; K. Sverlow; A. Packham; B. Barr; P. Conrad. 1997. Evidence of vertical transmission of *Neospora sp* infection in dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc.* 210:1169-1172.
- 3 Andresen, H. 1999. Neosporosis en el Perú y el Mundo. *Rev. Cienc. Vet.* 15: 11-16.
- 4 Armitage, P.; G. Berry. 1997. Statistical methods in medical research 2nd ed. Blackwell Scientific Publ. U. K. p 115-120
- 5 Atocsa, J.; A. Chávez; E. Casas; N. Falcón. 2005. Seroprevalencia de *Neospora caninum* en bovinos lecheros criados al pastoreo en la provincia de Melgar- Puno. *Rev. investig. vet. Perú.* 16(1):70-75.
- 6 Baker, D.; T. Morishita; D. Brooks; S. Shen; D. Lindsay; J. Dubey. 1995. Experimental oral inoculations in birds to evaluate potential definitive hosts of *Neospora caninum*. *J. Parasitol.* 81, 783-785.
- 7 Barber, J. 1998. Canine Neosporosis waltham focus. 8:25-29
- 8 Barber, J.; A. Trees. 1996. Clinical aspects of 27 cases of neosporosis in dogs. *Veterinary Record.* 139: 439–43.
- 9 Barber, J.; C. Payne; A. Trees. 1996. Distribution of *Neospora caninum* within the central nervous system and other tissues of six dogs with clinical neosporosis. *J Small Anim Pract.* 37:568-574.
- 10 Barber, S.; L. Van; I. Ham; I. Polis; J. Trees. 1997a. Seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* Belgian dogs. *Small Anim Pract.* 38: 15-16

- 11 Barber, S.; R. Gaser; J. Ellis; M. Reichel; D. McMillan; J. Trees. 1997b. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in different canid populations. J. Parasitol; v 83, p 1056-1058.
- 12 Barr, B.; M. Anderson; J. Dubey; P. Conrad. 1991a. *Neospora*-like protozoal infections associated with bovine abortions. *Vet. Pathol.* 28: 110-116.
- 13 Barr, B.; P. Conrad; J. Dubey; M. Anderson. 1991b. *Neospora* – Like encephalomyelitis in a calf: pathology, ultrastructure, and immunoreactivity. J Vet Diagn Invest. 3: 39-46.
- 14 Barr, B.; M. Anderson; K. Sverlow; P. Conrad. 1995. Diagnosis of bovine fetal *Neospora* infection with an indirect fluorescent antibody test. *Vet. Rec.* 137, 611-613.
- 15 Barr, B.; M. Anderson; L. Woods; J. Dubey; P. Conrad. 1992. *Neospora* – Like protozoan infections associated with abortion in goat. J Vet Diagn Invest. 4:365-367.
- 16 Barr, B.; I. Bjerkäs; D. Buxton; P. Conrad; J. Dubey; J. Ellis; M. Jenkins; S. Johnston; D. Lindsay; D. Sibley; A. Trees; W. Wouda. 1997. Neosporosis: Sport of the internacional Neospora Workshop. The compendium: food animal. Parasitol. 19: 120-127.
- 17 Barling, K.; Sherman; M. Peterson; J. Thompson; J. McNeill; T. Craig; G. Adams. 2000. Spatial associations among density of cattle, abundance of wild canids and seroprevalence to *Neospora caninum* in a population of beef calves. Journal of the American Veterinary Medical Association. 217: 1361-1365.
- 18 Basso, W.; L. Venturini.; M. Venturini; D. Hill; O. Kwok; S. Shen; J. Dubey. 2001a. First isolation of *Neospora caninum* from the feces of a naturally infected dog. J Parasitol. 87:612-618.
- 19 Basso, W.; L. Venturini; L.; M.C. Venturini; P. Moore; M. Rambeau; J. M. Unzaga; C. Campero; D. Bacigalupe; J. P. Dubey.. 2001b. Prevalence of *Neospora caninum* infection in dogs from beef cattle farms, dairy farms, and from urban areas of Argentina. *J. Parasitol.*, v.87, p.906-907.
- 20 Basso, W; M. Venturini; D. Bacigalupe; M. Kienast; J. Unzaga; A. Larsen; M. Machuca; L. Venturini. 2005. Confirmed clinical *Neospora caninum* infection in a boxer puppy from Argentina. Veterinary Parasitology 131: 299–303

- 21 Baszler, T.; M. Long; T. McElwain; B. Mathison. 1999. Interferon-gamma and interleukin- 12 mediate protection to acute *Neospora caninum* infection in BALB/c mice. *Int.J.Parasitol.* 29:1635-1646.
- 22 Bjerkas, I.; S. Mohn; J. Presthus. 1984. Unidentified cystforming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Z. Parasitenkd.* 70: 271-274.
- 23 Bjerkas, I.; M. Jenkins; J. Dubey. 1994. Identification and characterization of *Neospora caninum* tachyzoite antigens useful for diagnosis of neosporosis. *Clin.Diagn.Lab Immunol.* 1, 214-221.
- 24 Björkman, C.; A. Ugglä. 1999. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. *Int.J.Parasitol.* 29, 1497-1507.
- 25 Boulton, J.; R. Cook; G. Fraser. 1995. Bovine *Neospora* abortion in north eastern news auth wales. *Aust Vet J.* 72:119-120.
- 26 Boyd, S.; P. Barr; H. Brooks; J. Orr. 2005. Neosporosis in a young dog presenting with dermatitis and neuromuscular signs. *J. Small animal practice.* 46: 85-88.
- 27 Britlain, R. 2000. A review of current reports on bovine neosporosis. *AETE newsletter*, 11:8-10.
- 28 Buxton, D.; M. McAllister; J. Dubey. 2002. The comparative pathogenesis of neosporosis. *Trends in Parasitology.*18: 546-553.
- 29 Buxton, D.; S. Maley; S. Wright; K. Thomson; A. Rae; A. Innes. 1998. The pathogenesis of experimental neosporosis in pregnant sheep. *J.Comp Pathol.* 118: 267-279.
- 30 Campero, C.; M. Anderson; G. Conosciuto; H. Odriozola; G. Bretschneider; M. Poso. 1998. *Neospora caninum*-associated abortion in a dairy herd in Argentina. *Vet. Rec.* 143, 228-229.
- 31 Canon-Franco, W.; D. Bergamaschi; M. Labruna; L. Camargo; S. Souza; J. Silva; A. Pinter; J. Dubey; S. Gennari. 2003. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs from Amazon, Brazil. *Vet Parasitol.* 115(1):71-74.
- 32 Cantile, C.; M. Arispeci. 2002. Necrotizing cerebellitis due to *Neospora caninum* infection in an old dog. *Journal of Veterinary Medicine.* 49:1-47.
- 33 Chávez, A; E. Serrano; E. Casas; L. Ortega-Mora. 2002. *Neospora caninum* en Camélidos Sudamericanos Peruanos.*Rev. Investig. Vet. Perú.*3 (2).92-93.

- 34 Cheadle, M.; D. Lindsay; B. Blagburn,. 1999a. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs. *Vet Parasitol.* 85(4): 325-30.
- 35 Cheadle, M.; M. Spencer; B. Blagburn. 1999b. Seroprevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in non-domestic felids from Southern Africa. *J. Zoo Wildlife Med.* 30: 248-251.
- 36 Ciaramella, P.; M. Corona; L. Cortese; D. Piantedosi; D. Santero; A. Di Loria; R. Regato. 2004. Seroprevalence of *Neospora* sp. in asymptomatic horses in Italy. *Vet. Parasitol.* 123: 11-15.
- 37 Collantes-Fernandez, E.; A. Zaballos; G. Alvarez-Garcia; L. Ortega-Mora. 2002. Quantitative detection of *Neospora caninum* in bovine aborted fetuses and experimentally infected mice by real-time PCR. *J.Clin.Microbiol.* 40, 1194-1198.
- 38 Conraths, F.; C. Bauer; W. Becker. 1996. Detection of antibodies against *Neospora caninum* in cows on Hessian farms with abortion and fertility problems. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* 103, 221-224.
- 39 Cornejo, N.; A. Chávez; E. Casas; C. Arana. 2004. Seroprevalencia de *Neospora caninum* en perros de establos lecheros de la cuenca izquierda del Valle del Mantaro. *Rev. Investig. Vet. Perú.* 15(1):70-75.
- 40 Daniel, W. 1996. Bioestadística: base para el análisis de la ciencia de la salud. 5ta ed. p 205-207. Ed. Limusa. México.
- 41 Del Campo, J.; A. Chávez; A. Delgado; N. Falcon; A. Ornelas; E. Casas; E. Serrano. 2003. Frecuencia de *Neospora Caninum* en perros de establos lecheros del valle de Lima. *Rev. Investig. Vet. Perú.* 14(2):145-149.
- 42 Dijkstra, T.; H. Barkema; J. Hesselink; W. Wouda. 2002a. Point source exposure of cattle to *Neospora caninum* consistent with periods of common housing and feeding and related to the introduction of a dog. *Vet Parasitol* 105: 89–98.
- 43 Dijkstra, T.; H. Barkema; M. Eysker; J. Hesselink; W. Wouda. 2002b. Natural transmission routes of *Neospora caninum* between farm dogs and cattle. *Vet Parasitol.* 105: 99–104.
- 44 Dijkstra, T.; M. Eysker; G. Schares; F. Conraths; W. Wouda; H. Barkema. 2001. Dogs shed *Neospora caninum* oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrum spiked with *Neospora caninum* tachyzoites. *Int J Parasitol.* 31:747-752.

- 45 Dubey, J. 2003. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. The Korean Journal of Parasitology. 41:1-16.
- 46 Dubey, J.; D. Lindsay. 1990. *Neospora caninum* induced abortion in sheep. *J.Vet.Diagn.Invest* 2, 230-233
- 47 Dubey, J.; A. De Lahunta. 1993. Neosporosis associated congenital limb deformities in a calf. *Appl. Parasitol.* 34, 229-233.
- 48 Dubey, J.; D. Lindsay. 1996. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Veterinary Parasitology.* 67: 1-59.
- 49 Dubey, J.; A. Koestner; R. Piper. 1990. Repeated transplacental transmission of *Neospora caninum* in dogs. *J Am. Vet. Med. Assoc.* 197:857-60.
- 50 Dubey, J.; A. Hattel; D. Lindsay; M. Topper. 1988a. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 193, 1259-1263.
- 51 Dubey, J.; J. Carpenter; C. Speer; M. Topper; A. Uggla. 1988b. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association.* 192: 1269-1285.
- 52 Dubey, J.; J. Morales; P. Villalobos; D. Lindsay; B. Blagburn; M. Topper. 1996. Neosporosis-associated abortion in a dairy goat. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 208, 263-265.
- 53 Dubey, J.; B. Barr; J. Barta; I. Bjerkas; C. Björkman; B. Blagburn; D. Bowman; D. Buxton; J. Ellis; B. Gottstein; A. Hemphill; D. Hill; D. Howe; M. Jenkins; Y. Kobayashi; B. Koudela; A. Marsh; J. Mattsson; M. McAllister; D. Modry; Y. Omata; L. Sibley; C. Speer; A. Trees; A. Uggla; S. Upton; D. Williams; D. Lindsay. 2002. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. *Int.J.Parasitol.* 32: 929-946.
- 54 Ellis, J.; K. Luton; P. Baverstock; P. Brindley; K. Nimmo; A. Johnson. 1994. The phylogeny of *Neospora caninum*. *Mol.Biochem.Parasitol.* 64, 303-311.
- 55 French, N.; D. Clancy; H. Davison; A. Trees. 1999. Mathematical model of *Neospora caninum* infection in dairy cattle: transmission and options for control. *Int. J Parasitol.* 29: 1691-1704.
- 56 Gondim, L.; L. Gao; M. McAllister. 2002. Improved production of

- Neospora caninum* oocysts cyclical oral transmission between dogs and cattle, and in vitro isolation from oocysts. J. Parasitology. 88: 1159-1163.
- 57 Gondim, L.; M. McAllister; W. Pitt; D. Zemlicka. 2004a. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. Int. J. Parasitol. 34, 159–161.
- 58 Gondim, L.; M. McAllister; R. Anderson-Sprecher; C. Bjorkman; T. Lock; L. Firkins; L. Gao; W. Fischer. 2004b. Transplacental transmission and abortion in cows administered *Neospora caninum* oocysts. J. Parasitol. 90, 1394–1400.
- 59 González, L.; D. Buxton; R. Atxaerandio; G. Aduriz; S. Maley; J. Marco; L. Cuervo. 1999. Bovine abortion associated with *Neospora caninum* in northern Spain. Vet.Rec. 144:145-150.
- 60 Gottstein, B.; S. Eperon; W. Dai; A. Cannas; A. Hemphill; G. Greif. 2001. Efficacy of Toltrazuril and Ponazuril against experimental *Neospora caninum* infection in mice. Parasitol Res. 87: 43-48.
- 61 Gottstein, B.; B. Hentrich; R. Wyss; B. Thur; A. Busato; K. Stark; N. Müller. 1998. Molecular and immunodiagnostic investigations on bovine neosporosis in Switzerland. Int. J. Parasitol. 28, 679-691.
- 62 Hemphill, A., B. Gottstein; H. Kaufmann. 1996. Adhesion and invasion of bovine endothelial cells by *Neospora caninum*. Parasitology 112 (Pt 2), 183-197.
- 63 Hilali, M.; S. Romand; P. Thulliez; O. Kwok; J. Dubey. 1998. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in sera from camels from Egypt. Vet. Parasitol. 75, 269-271.
- 64 Horna, M.; A. Chávez; H. Rivera; E. Casas y E. Serrano. 2003. Seroprevalencia de *Neospora caninum* en caninos en dos distritos de la provincia de Chachapoyas. Rev. Investig. Vet. Perú.14(2)
- 65 Hoskins, J.; M. Bunge; J. Dubey; D. Duncan. 1991. Disseminated infection with *Neospora caninum* in a ten-year-old dog.Cornell Vet. 81: 329 – 334.
- 66 Howe, D. y L. Sibley. 1999. Comparison of the major antigens of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. Int.J.Parasitol. 29, 1489-1496.
- 67 Innes, E.; A. Andrianarivo; C. Bjorkman; D. Williams; P. Conrad. 2002. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. Trends Parasitol. 18: 497-504.

- 68 Innes, E.; W. Panton; J. Marks; A. Trees; J. Holmdahl; D. Buxton. 1995. Interferon gamma inhibits the intracellular multiplication of *Neospora caninum*, as shown by incorporation of Huracil. *Journal of Comparative Pathology*. 113: 95-100.
- 69 Innes, E.; S. Wright; S. Maley; A. Rae; A. Schock; E. Kirvar; P. Bartley; C. Hamilton; I. Carey; D. Buxton. 2001. Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. *Int. J Parasitol.* 31:1523-1534.
- 70 Jakubek, E.; C. Brojer; C. Regnersen; A. Uggla; G. Schares; C. Björkman. 2001. Seroprevalences of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in Swedish red foxes (*Vulpes vulpes*). *Vet. Parasitol.* 102, 167-172.
- 71 Jung-Hwa, CHO.; C. Woo-Suk; S. Kyoung-Ju; N. Byoung-Kuk; K. Seung-Won; Chul-Yong; I. Tong-Soo.2005. Protective efficacy of vaccination with *Neospora caninum* multiple recombinant antigens against experimental *Neospora caninum* infection .*The Korean Journal of Parasitology*.43: 19-25.
- 72 Kasper, L. y I. Khan. 1998. Antigen-specific CD8+ T cells protect against lethal toxoplasmosis in mice infected with *Neospora caninum*. *Infect.Immun.* 66, 1554-1560.
- 73 Klein, F.; S. Hietala; H. Berthet; P. Very; D. Gradinaru. 1997. *Neospora caninum*: enquête sérologique sur les avortements des bovines normands et charolais. *Le Point Veterinaire*. 88, 1283-1286.
- 74 Kobayashi, Y.; M. Yamada; Y. Omata; T. Koyama; A Saito; T. Matsuda; K. Okuyama; S. Fujimoto; H. Fukuoka; T. Matsui. 2001. Naturally- Occurring *Neospora caninum* infection in an adult sheep and her twin fetuses. *The Journal of Parasitol.* 87:434-435.
- 75 Kritzner, S.; H. Sager; J. Blum; R. Krebber.; G. Greif.; B. Gottstein. 2002. An explorative study to assess the efficacy of toltrazuril-sulfone (Ponazuril) in calves experimentally infected with *Neospora caninum*. *Annals of clinical microbial and antimicrobials*. 1:1-10.
- 76 Lindsay, D.; J. Dubey. 1989a. Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. *Am.J.Vet.Res.* 50, 1981-1983.
- 77 Lindsay, D.; J. Dubey. 1989b. Evaluation of anti-coccidial drugs' inhibition of *Neospora caninum* development in cell cultures. *J.Parasitol.* 75,990-992.
- 78 Lindsay, D; J. Dubey. 1990. Infections in mice with tachyzoites and bradyzoites of *Neospora caninum*. *J.Parasitol.* 76, 410-413.

- 79 Lindsay, D.; B. Blagburn; J. Dubey. 1992. Factors affecting the survival of *Neospora caninum* bradyzoites in murine tissues. *J. Parasitol.* 78, 70-72.
- 80 Lindsay, D.; S. Upton.; J. Dubey. 1999. A structural study of the *Neospora caninum* oocyst. *Int J for Parasitol.* 29: 1521-1523.
- 81 Lindsay. D.; D. Ritter; D. Brake. 2001. Oocyst Excretion in Dogs Fed Mouse Brains Containing Tissue Cysts of a Cloned Line of *Neospora Caninum*. 87: 909-911.
- 82 Lindsay, D.; J. Butler; N. Rippey; B. Blagburn. 1996a. Demonstration of synergistic effects of sulfonamides and dihydrofolate reductase/thymidylate synthase inhibitors against *Neospora caninum* tachyzoites in cultured cells, and characterization of mutants resistant to pyrimethamine. *Am. J. Vet. Res.* 57: 68-72.
- 83 Lindsay, D.; N. Rippey; R. Cole; L. Parsons; J. Dubey; R. Tidwell; B. Blagburn. 1994. Examination of the activities of 43 chemotherapeutic agents against *Neospora caninum* tachyzoites in cultured cells. *Am.J.Vet.Res.* 55, 976-981.
- 84 Lindsay, D.; H. Steinberg; R. Dubielzig S. Semrad; D. Konkle; P Miller; B. Blagburn. 1996b. Central nervous system neosporosis in a foal. *J. et. Diagn. Invest* 8, 507-510.
- 85 Lobato, J.; D. Silva; T. Mineo; J. Amaral; G. Silva; J. Costa – Cruz; M. Ferreira; A. Borges; J. Mineo. 2006. Detection of immunoglobulin G antibodies to *Neospora caninum* in humans: high seropositivity rates in patients Who are infected by human immunodeficiency virus or have neurological disorders. *Clin Diagn lab Immunol.* 13: 84 – 89.
- 86 Long, M.; T. Baszler. 2000. Neutralization of maternal IL-4 modulates congenital protozoal transmission: comparison of innate versus acquired immune responses. *J.Immunol.* 164, 4768-4774.
- 87 Lorenzo, V.; M. Pumarola.; S. Siso. 2002. Neosporosis with cerebellar involvement in adult dog. *Journal of Small Animal Practice.* 43: 76-79.
- 88 Lunden, A.; J. Mark; S. Maley; E. Innes. 1998. Cellular immune responses in cattle experimentally infected with *Neospora caninum*. *Parasite immunology.*20: 519- 526.
- 89 Maanen, C.; W. Wouda.; G. Schares.; D. Blumröder.; F. Conraths.; R. Norton.; D. Williams.; I. Esteban.;E. Innes.; J. Mattsson.; C. Björkman.; A.

- Fernández.;L. Ortega-Mora.; N. Müller.; H. Sager.; A. Hemphill. 2004. An interlaboratory comparison of immunohistochemistry and PCR methods for detection of *Neospora caninum* in bovine foetal tissues. *Vet Parasitol.* 8-16.
- 90 Marsk, A.; D.K. Howe; G. Wang; B. C. Barr; N. Cannon; P. A. Canrad.. 1999. Differentiation of *Neospora hughesi* from *Neospora caninum* based on their immunodominant surface antigen, SAG1 and SRS2.*Int J for Parasitol.* 29: 1575-1582.
- 91 McAllister, M. 2005. The comparative pathology of neosporosis I Fórum Brasileiro de Estudos sobre *Neospora caninum* São Paulo.14-16.
- 92 McAllister, M; C. Bjorkman; R. Anderson-Sprecher; D. Rogers. 2000. Evidence of point-source exposure to *Neospora caninum* and protective immunity in a herd of beef cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 217, 881–887.
- 93 McAllister, M.; E. Huffman; S. Hietala; P. Conrad; M. Anderson; M. Salman, 1996. Evidence suggesting a point source exposure in an outbreak of bovine abortion due to neosporosis. *J. Vet. Diagn. Invest.* 8, 355–357.
- 94 McAllister, M., J. Dubey; D. Lindsay; W. Jolley; R. Wills; A. McGuire. 1998. Dogs are definitive hosts *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.*28: 1473- 1478.
- 95 Mineo, T.; R. Machado. 2005. Kinetics of TCD4+ and TCD8+ lymphocyte populations in dogs experimentally infected with *Neospora caninum*. “I Fórum Brasileiro de Estudos sobre *Neospora caninum*”, 15 – 16 de setiembre del 2005.
- 96 Moen, A.; W. Wouda; M. Mul; E. Graat; T. Werven. 1998: Increased risk of abortion following *Neospora caninum* abortion outbreak: a retrospective study in four dairy herds. *Theriogenology* 49: 1301-1309
- 97 Moore, D. P.; A. Odeón.; C. Campero. 2001. Neosporosis bovina: una actualización. *Vet Arg.* XVIII. 180: 752-775.
- 98 Moreno Terrazas, E.; A. Canales Gutiérrez; L. Flores Cuba; D. Pineda Macedo; D. Aranibar Huaquisto. 1998. Punto Focal. Estrategia regional para la conservación y utilización sostenible de la diversidad biológica. Consejo Nacional del Ambiente (CONAM). p 55.
- 99 Moya, R.; A. Chávez; E. Casas; E. Serrano; N. Falcón; D Pezo. 2003. Seroprevalencia de *Neospora caninum* en llamas de la provincia de Melgar, Puno. *Rev Inv Vet Perú.* 14: 155-160.

- 100 Naguleswaran, A.; A. Cannas; N. Keller; N. Vonlaufen; G. Schares; F. Conraths; C. Björkman; A. Hemphill. 2001. *Neospora caninum* microneme protein NcMIC3: secretion, subcellular localization, and functional involvement in host cell interaction. *Infect. Immun.* 69, 6483-6494.
- 101 Nam, H.; S. Kang; W. Choi. 1998. Antibody reaction of human anti *Toxoplasma gondi* positive and negative sera with *Neospora caninum* antigens. *Koreans J Parasitol.* 36: 269 – 275.
- 102 Ortega-Mora, L.; A. Quintanilla.; J. Pereira. 1997. *Neospora ovina* y caprina: conocimientos actuales. *Rev. Vet. Aula vet.* 75-81.
- 103 Ortega-Mora, L.; E. Collantes.; G. Álvarez. 2001. La Neosporosis del ganado bovino: Una enfermedad Emergente. *Rev. Cien. Vet.* 17.1:7-14.
- 104 Packham, A.; K. Sverlow; P. Conrad; E. Loomis; J. Rowe; M. Anderson; A. Marsh; C. Cray; B. Barr. 1998. A modified agglutination test for *Neospora caninum*: development, optimization, and comparison to the indirect fluorescent-antibody test and enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin.Diagn.Lab Immunol.* 5: 467-473.
- 105 Paré, J., S. Hietala; M. Thumond. 1995. Interpretation of and indirect fluorescence antibody test for diagnosis of *Neospora sp.* infection in cattle. *J.vet. diagn.invest.* 7: 273-275.
- 106 Paré, J., G. Fecteau,., M. Fortin,., G. Marsolais. 1998. Seroepidemiologic study of *Neospora caninum* in dairy herds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 213, 1595–1598.
- 107 Pereira-Bueno, J.; A. Quintanilla-Gozalo; A. Seijas-Carballedo,E. Costas; L. Ortega-Mora. 2000. Observational studies in *Neospora caninum* infected dairy cattle: pattern of transmission and age-related antibody fluctuations, in: Hemphill, A., Gottstein, B. A European perspective on *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* 30, 877- 924.
- 108 Peters, M.; E. Lutkefels; A. Heckeroth; G. Schares. 2001. Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle. *Int J Parasitol.* 31:1144-1148.
- 109 Petersen, E.; M. Lebech; L. Jensen; P. Lind; M. Rask; P. Bagger; C. Björkman; A. Ugglä.1999. *Neospora caninum* Infection and Repeated Abortions in Humans. *Emerging infectious diseases.* 5: 278-281.

- 110 Quevedo, J.; A. Chávez; H. Rivera; E. Casas; E. Serrano. 2003. Neosporosis en bovinos lecheros en dos distritos de la provincia de Chachapoyas. *Rev. Inv. Vet. Perú* 14: 33-37.
- 111 Quintanilla, A.; J. Pereira-Bueno; A. Seijas; E. Costas; L. Ortega-Mora. 2000. Observational studies in *Neospora caninum* infected dairy cattle: relationship infection-abortion and gestational antibody fluctuations, in: Hemphill, A., Gottstein, B. A European perspective on *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* 3:, 877-924.
- 112 Quintanilla, A.; J. Pereira; E. Tabarés; E. Innes; R. Gonzáles; L. Ortega. 1999. Seroprevalence of *Neospora caninum* Infection in dairy and beef cattle in Spanning. *Int J Parasitol.* 29: 1201-1208.
- 113 Reichel, M. 2000. *Neospora caninum* infections in Australia and New Zeland. *Aust Vet J.* 78: 258
- 114 Rivera. H.; D. Nelson; L. Tabacchi. 2000. *Neospora caninum* y otros agentes en fetos abortados de bovinos lecheros del valle de Lima. *Rev. Inv. Vet. Perú* 11: 1-7.
- 115 Rojas, M. 2004. Nosoparasitosis de los rumiantes domésticos peruanos. P: 128-131. Lima- Perú.
- 116 Sasai, K.; H. Lillehoj; A. Hemphill; H. Matsuda; Y. Hanioka; T. Fukata; E. Baba; A. Arakawa. 1998. A chicken anti-conoid monoclonal antibody identifies a common epitope which is present on motile stages of *Eimeria*, *Neospora*, and *Toxoplasma*. *J.Parasitol.* 84: 654-656.
- 117 Schares, G.; M. Peters; R. Wurm; A. Barwald; F. Conraths. 1998. The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analysed by serological techniques. *Vet.Parasitol.* 80, 87-98.
- 118 Silva, P.; A. Chávez; H. Rivera; E. Casas. 2002. Seroprevalencia de *Neospora caninum* en bovinos lecheros del Valle de Lima. *Rev. Inv. Vet. Perú* 13: 51-55.
- 119 Thilsted, J.; J. Dubey. 1989. Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle. *J Vet Diagn Invest.* 1: 205-209.
- 120 Thrusfield, M. 1990. Epidemiología veterinaria. p 228-230. Ed. Acribia. Zaragoza, España.
- 121 Thumond, M.; S. Hietala. 1997a. Effect of congenitally acquired *Neospora caninum* infection on risk of abortion and subsequent abortions in dairy

- cattle. AJVR. 58: 1381-1385.
- 122 Thumond, M.; S. Hietala. 1997b. Effect of *Neospora caninum* on milk production in first-lactation dairy cows. JAVMA.210: 672-750.
 - 123 Tranas, J.; R. Heinzen; L. Weiss; M. McAllister. 1999. Serological Evidence of Human Infection with the Protozoan *Neospora caninum*.
 - 124 Trees, A.; F. Guy; J. Low; L. Roberts; D. Buxton; J. Dubey.1994. Serological evidence implicating *Neospora* species as a cause of abortion in British cattle. Vet. Rec. 134, 405-407.
 - 125 Ugglä, A; S. Stenlund; O. Holmdahl; E. Jakubek; P. Thebo; H. Kindahl; C. Björkman. 1998. Oral *Neospora caninum* inoculation of neonatal calves. International Journal for Parasitology .28:1467-1472.
 - 126 Williams, D.; J. Trees. 2006. Protecting babies: vaccine strategies to prevent foetopathy in *Neospora caninum* -infected cattle. *Parasite Immunology*.28:61-67.
 - 127 Williams, J.; I. Espie; E. Van Wilpe; A. Matthee. 2002. Neosporosis in a white rhinoceros (*Ceratotherium simum*) calf. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 73, 38-43.
 - 128 Williams, D.; C. Guy; J. McGarry; F. Guy; L. Tasker; R. Smith; K. MacEachern; P. Cripps; D. Kelly; A. Trees. 2000. *Neospora caninum*-associated abortion in cattle: the time of experimentally induced parasitaemia during gestation determines foetal survival. *Parasitology* 121: 347-358.
 - 129 Wouda, W.; T. Dijkstra; A. Kramer; C. Van Maanen; J. Brinkhof. 1999. Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infections in dogs and cattle. *Int J Parasitol*.29(10):1677-82.
 - 130 Yaeger, M.; S. Shawd-Wessels; P. Leslie-Steen. 1994. *Neospora* abortion storm in a midwestern dairy. *J. Vet. Diagn. Invest.* 6, 506–508.